



Desenvolvimento de bebidas fermentadas a partir de subprodutos da indústria da castanha

Daniel Filipe Cortês Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa



Lisboa, 2015

Agradecimentos

À professora Catarina Prista, orientadora, por todo o apoio prestado e conhecimento transmitido na elaboração deste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório Sara Carvalho e Rafaela Santos por toda a ajuda prestada nas tarefas laboratoriais ao longo da elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos Guilherme Pimentel, Pedro Marques, Mauro Rodrigues, Ruben Porfírio, Pedro Nobre, Carlos Tadeu, Fábio Laranjeira, João Martins, Marcelo Ramires, Bruno Pedras, João Rodrigues, Carlos Tavares, André Sobral, Sofia Nunes, Carolina Pereira, Ana Isabel e Rute Pinto por todo o apoio, amizade e momentos de descontração proporcionados, essenciais a um bom desempenho neste processo.

Às minhas afilhadas Nádia Figueiredo, Ana Oliveira e Catarina Morgado por todas as palavras de apoio e carinho que tornaram todo este trabalho consideravelmente mais fácil.

À minha namorada Laura Carrilho, por todo o amor, apoio e dedicação nos momentos bons e menos bons, sendo essencial para ultrapassar qualquer dificuldade.

Aos meus pais, Maria do Céu e Vítor Costa por toda a paciência, apoio e carinho incondicionais em todos os momentos, estando sempre presentes.

Resumo

A indústria alimentar é uma indústria cada vez mais exigente, quer a nível de qualidade quer a nível de segurança. Os consumidores procuram satisfazer as suas necessidades e preferências, e as empresas procuram ir ao encontro destas criando novos produtos fruto da competição e tentativa de inovação entre as empresas. De entre os produtos inovadores, os alimentos e bebidas fermentadas têm vindo a ganhar adeptos, não só pelas suas propriedades funcionais como também pelo que trazem frequentemente de surpresa e variedade.

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar uma bebida fermentada produzida a partir de subprodutos da indústria da castanha utilizando para tal o método de produção do *saké* de arroz,

O método utilizado teve por base a utilização simultânea de um fungo (*Aspergillus oryzae*) na forma de *koji*, e de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Durante este processo ocorre hidrólise do amido pelas amilases produzidas pelo fungo produzindo açúcares mais simples, que são fermentados por leveduras com produção de álcool,

Numa primeira fase, foram testadas diversas formulações, com vista a determinar quais os elementos necessários a produzir a melhor bebida possível organoleticamente, variando o tipo de *koji*, o tipo/proporção de substrato a fermentar e a estirpe de levedura.

Após o teste de 16 formulações, a mais adequada, resultou da utilização de *koji* produzido a partir de arroz, castanha crua como substrato e a estirpe de levedura *Saccharomyces cerevisiae* CBS 436, que conferiu um perfil muito aromático ao produto final. Atingiu um teor alcoólico de 13,25% (vol/vol).

A avaliação sensorial em termos de aceitação por parte de um painel de provadores não treinados (consumidores), permitiu verificar que a bebida obtida obteve uma resposta moderadamente positiva quer na forma mais concentrada quer mais diluída relativamente à cor, aroma e sabor (valores entre 6 e 7, numa escala de 1 a 9). No entanto, a intenção de compra ficou muito perto da indiferença (valores de 2,96875 para a amostra A e 3,03125 para a amostra B, numa escala de 1 a 5).

Palavras-chave: *Koji*, *saké*, sub-produtos de castanha, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

The food industry is an increasingly demanding industry, regarding both quality and safety. Consumers are keen to satisfy their needs and preferences, and the industry try hard to satisfy them, by producing new products resulting from competition among companies and innovation capacity. Fermented foods and beverages are among some of the most popular innovative products, because they frequently ally functional properties to surprise and variety.

The main objective of this work was to develop and optimize a fermented drink produced from by-products of the chestnut industry centred on the ancestral rice *saké* methods.

The production method for this drink was based on the simultaneous utilization of a mold (*Aspergillus oryzae*) as *koji* and yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*). During this process, starch is hydrolysed by amylases produced by the mold, resulting in more simple sugars that will be fermented by the yeast producing ethanol.

Preliminary assay were performed in order to determine which were the best elements to produce a tasty beverage. We tested different formulations, varying the type of *koji*, the type /proportion of substrate to ferment and the yeast strain.

After testing 16 formulations, the most adequate one was determined, using *koji* produced from rice, raw chestnut as substrate and the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* CBS 436, which added a very aromatic profile to the final product. It reached an alcohol content of 13,25% (vol/vol).

Sensory analysis performed by a non-trained panel of consumers moderately liked the concentrated and the diluted version of the selected beverage, both in terms of taste, colour and flavour (values between 6 and 7, in a scale of 1 to 9). However, in terms of acceptance by the tasters in the sensory analysis they show a buying intention near the indifference (values of 2.96875 for sample A and 3.03125 sample B, a scale of 1 to 5).

Keywords: *Koji*, *saké*, chestnut by-products, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas	ix
Lista de termos.....	x
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1 Produtos alimentares inovadores	2
2.2 Enquadramento histórico e cultural do <i>saké</i>	6
2.2.1 Tipos mais relevantes de <i>saké</i>	7
2.2.2 Composição do <i>saké</i>	8
2.3 Microrganismos envolvidos na produção de <i>saké</i>	9
2.3.1 <i>Aspergillus oryzae</i>	9
2.3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.4 Substratos.....	13
2.4.1 Arroz	13
2.4.2 Castanha.....	16
2.5 <i>Koji</i>	19
2.6 <i>Saké</i>	20
2.6.1 Esquema geral de produção	20
2.6.2 Descrição das etapas de produção	21
2.7 Análise sensorial	27
2.8 Objetivos	28
3. Material e métodos.....	29
3.1 Substratos usados	29

3.2	Meios de cultura.....	29
3.3	Estirpes usadas.....	29
3.3.1	Manutenção das culturas	30
3.4	Preparação dos substratos.....	31
3.4.1	Arroz carolino.....	31
3.4.2	Castanha pilada congelada	32
3.5	Produção de <i>koji</i>	33
3.6	Fermentação.....	34
3.6.1	Preparação do <i>starter</i> ou <i>moto</i>	34
3.6.2	Preparação do inóculo de levedura	35
3.6.3	Mistura principal.....	37
3.7	Tratamento e análise das amostras	41
3.7.1	Amostragem.....	41
3.7.2	Curvas de calibração.....	41
3.7.3	Tratamento das amostras e soluções para HPLC	42
3.7.4	Preparação do eluente	43
3.7.5	HPLC	43
3.8	Provas sensoriais.....	44
4	Resultados e discussão.....	45
4.1	Condições de produção de <i>koji</i>	45
4.2	Formulações preliminares	46
4.2.1	Avaliação do efeito da estirpe de levedura em <i>saké</i> de castanha produzido a partir de castanha crua e <i>koji</i> de arroz (A436, A1198, C436, C1198)	46
4.2.2	Avaliação do efeito da estirpe de levedura em <i>saké</i> de castanha produzido a partir de castanha crua e <i>koji</i> de castanha (A, B)	51
4.2.3	Avaliação do efeito da estirpe de levedura em <i>saké</i> de castanha produzido a partir de castanha cozida e <i>koji</i> de castanha (C,D).....	53
4.2.4	Comparação entre o <i>saké</i> de castanha produzido a partir de castanha cozida, castanha crua e substrato misto usando <i>koji</i> de arroz (E, F, G, H, I, J)	55

4.2.5	Formulação final.....	60
4.3	Análise sensorial	61
5.	Discussão geral e perspectivas futuras.....	65
6.	Referências bibliográficas	67
Anexos	71
Anexo I	72
Anexo II	73
Anexo III	74
Anexo IV	76
Anexo V	77

Índice de figuras

Figura 1: Processo de desenvolvimento de um produto inovador.....	3
Figura 2: Possíveis origens de ideias para inovação	4
Figura 3: Constituição do grão de arroz.....	13
Figura 4: Esquema das etapas do processamento do grão de arroz para produção de sake	14
Figura 5: Cálculo do valor de seimai-buai.....	15
Figura 6: Grãos de arroz com diferentes níveis de polimento	15
Figura 7: Esquema das etapas de processamento da castanha.....	17
Figura 8: Aplicações de vários subprodutos da indústria da castanha.....	19
Figura 9: Esquema das principais fases de produção do saké	20
Figura 10: Temperaturas previstas da mistura principal na fermentação	26
Figura 11: Culturas de <i>S. cerevisiae</i> (CBS436 e CBS1198) [A e B] e <i>A. oryzae</i> (CBS817.2) [C]	30
Figura 12: Arroz em imersão	32
Figura 13: Recipiente para banho com água e mangueiras acessórias.....	35
Figura 14: Estufa de pequenas dimensões.....	36
Figura 15: Espectrofotômetro e cuvette.....	36
Figura 16: Estufa de fermentação	39
Figura 17: Sistema de HPLC	44
Figura 18: Produção de koji de arroz (A) e koji de castanha (B)	45
Figura 19: Variação das concentrações de açúcares e etanol no starter (A436, A1198, C436 e C1198)	47
Figura 20: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação A436	48
Figura 21: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação A1198	48

Figura 22: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação C436	49
Figura 23: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação C1198	50
Figura 24: Formulações já preparadas (esquerda - arroz, direita - castanha)	51
Figura 25: Variação das concentrações de açúcares e etanol no starter (A e B)	52
Figura 26: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação A	53
Figura 27: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação B	53
Figura 28: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação C	54
Figura 29: Variação das concentrações de açúcares e etanol no starter (E, F, G, H)	55
Figura 30: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação E	56
Figura 31: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação F	56
Figura 32: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação G	57
Figura 33: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação H	57
Figura 34: Variação das concentrações de açúcares e etanol no starter (I, J)	58
Figura 35: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação I	59
Figura 36: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação J	59
Figura 37: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação Fc	61
Figura 38: Sexo dos provadores	62
Figura 39: Idade dos provadores	62
Figura 40: Avaliação do consumo de bebidas alcoólicas	62
Figura 41: Avaliação do consumo de saké.	62
Figura 42: Avaliação das características sensoriais	63

Índice de tabelas

Tabela 1: Valores técnicos de alguns dos principais tipos de saké	8
Tabela 2: Composição do saké comparativamente a outras bebidas.....	8
Tabela 3: Caracterização taxonómica de <i>Aspergillus oryzae</i>	9
Tabela 4: Principais enzimas produzidas por <i>Aspergillus Oryzae</i>	10
Tabela 5: Caracterização taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Tabela 6: Principais estirpes usadas na produção de <i>saké</i>	12
Tabela 7: Composição do arroz carolino cru.....	16
Tabela 8: Composição nutricional da castanha pilada	18
Tabela 9: Valor nutricional dos substratos utilizados.....	29
Tabela 10: Starters preparados neste trabalho	35
Tabela 11: Lista de formulações	37
Tabela 12: Quantidades iniciais de ingredientes para a mistura principal	38
Tabela 13: Quantidades de ingredientes ajustadas para koji concentrado e escassez de água.....	38
Tabela 14: Quantidades de ingredientes para formulações de volume reduzido.....	38
Tabela 15: Quantidades de ingredientes para formulações de volume reduzido e substrato misto (castanha crua + arroz cozido a vapor)	38
Tabela 16: Quantidades de ingredientes da formulação final.....	39

Lista de termos

Nihon-shu – saké

Sei-shu – saké

Nihon – Japão

Sei – Claro

Shu – Termo japonês referente a álcool

Ginjo – Variedade de *saké premium* realizado com arroz polido até 60% do seu tamanho original, com ou sem a adição de álcool

Dajingo – Variedade de *saké premium* realizado com arroz polido até 50% do seu tamanho original, com ou sem adição de álcool

Junmai (Ginjo ou Dajingo)– Variedade de *Ginjo*,ou *Dajingo* sem adição de álcool

Honjozo – Variedade de *saké* realizado com adição de álcool

Futsu-shu – Variedade de *saké* que não é classificada como variedade premium. *Saké* de mesa ou *saké* regular.

Akamara – Valor de doçura do *saké* (diferença entre o teor de glucose e acidez).

Jozo-alcohol – Álcool etílico ou de origem agrícola.

Moromi – Mistura principal no processo de fermentação composto pelo *moto*, koji, água e arroz.

Moto – Base fermentativa ou *starter* da levedura no processo de fermentação. Também designado como *Shubo*.

Seimai – referente ao passo de polimento do arroz durante a produção de *saké*, com o objectivo de remover as camadas externas do grão antes da fermentação.

Seimai-buai (Percentagem de Polimento do Arroz) – Indica a percentagem do arroz que fica após polimento em função do peso do grão de arroz inteiro

Sakektasu – Bolo de filtração

1. Introdução

No âmbito da obtenção de grau de mestre em Engenharia Alimentar, na especialização de Processamento de Alimentos, foi desenvolvido um trabalho experimental para a produção de uma bebida produzida a partir de subprodutos da indústria da castanha, nomeadamente, pedaços partidos durante o seu processamento bem como unidades de calibre e qualidade inferior.

Para obter esta bebida, foi utilizado o processo de produção do *saké*. O *saké* é uma bebida fermentada obtida tradicionalmente através da fermentação de arroz, cujos principais ingredientes são água, arroz e *koji* (arroz inoculado com esporos de *Aspergillus oryzae*). O termo *saké* pode dizer respeito a um grande número de bebidas fermentadas que variam grandemente nas suas condições fermentativas, dosagens e substrato utilizado.

Ocupando um lugar muito importante na religião e cultura do Japão há mais de 2000 anos, o *saké* é frequentemente apelidado de “*rice wine*”, embora o tenha mais semelhanças com cerveja, já que no seu processo fermentativo ocorre uma degradação inicial do amido presente no substrato em açúcares mais simples, já que o amido, sendo insolúvel em água, não pode ser fermentado diretamente. O *saké* é também apelidado de “*nihon-shu*” e “*sei-shu*”, (JSSM: NRIB, 2011), sendo que o termo “*shu*” partilha do mesmo caractere que “*saké*”, enquanto que “*nihon*” significa Japão (o termo completo é uma referência a esta bebida tradicional do país) e “*sei*” significa claro, numa alusão à transparência evidenciada pela bebida no final do processo produtivo.

No presente trabalho, foram testadas diversas formulações, visando a obtenção da bebida fermentada a partir de substratos ricos em amido, sensorialmente apelativa, tendo sido igualmente testado o procedimento mais adequado para a otimizar. Como substrato, foi maioritariamente utilizada a castanha e subprodutos da indústria de castanha congelada. Como controlo do processo foi utilizado arroz numa das formulações. Para além disso, testou-se a viabilidade da produção de um inóculo tipo *koji* produzido a partir de castanha inoculada com esporos de *A. oryzae* e o seu potencial na produção de bebidas fermentadas a partir de castanha em comparação com o *koji* tradicional.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Produtos alimentares inovadores

Os atuais mercados encontram-se numa constante competição por supremacia, sendo crucial inovar constantemente de forma a obter alguma diferenciação e, conseqüentemente, a conquista de novos mercados e otimização dos seus lucros.

A indústria alimentar é uma indústria cada vez mais exigente, quer a nível de qualidade quer a nível de segurança. Os consumidores procuram satisfazer as suas necessidades e preferências, sendo bombardeados com uma vasta variedade de produtos, fruto da competição e tentativa de inovação entre as empresas de uma determinada área. Assim sendo, é necessário uma aposta cada vez maior em novas tecnologias de produção por parte das empresas, no desenvolvimento de novos produtos que consigam suprir as necessidades crescentes e em estratégias comerciais com vista a cativar e fidelizar potenciais novos consumidores.

A inovação pode ser definida como a capacidade de prever cenários conjunturais, agarrar oportunidades e tirar proveito delas (Silva et al., 2009). Quando se trata de inovação, lida-se com um elevado risco e incerteza, sendo que esta não se limita a novos mercados, mas inclui também novas formas de servir mercados já maduros e fortemente estabelecidos (Silva et al., 2009).

Existem quatro tipos de inovação – the ‘4 Ps’ of innovation (Silva et al., 2009):

Inovação ao nível do produto (Product innovation) – Alterações nos produtos ou serviços que uma empresa oferece.

Inovação ao nível do processo (Process innovation) – Alterações na forma como os produtos ou serviços são produzidos e/ou distribuídos.

Inovação ao nível do posicionamento (Position innovation) – Alterações na forma como os produtos ou serviços são colocados no mercado.

Inovação ao nível do paradigma (Paradigm innovation) – Alterações nos modelos subjacentes à estrutura organizacional das empresas.

A longo prazo, as empresas são forçadas a algum nível de inovação, sob o risco de perda de poder económico nos mercados para os quais escoam os seus produtos, já que ao longo do tempo o avanço tecnológico é constante, tornando processos produtivos obsoletos e introduzindo outros novos, mais eficientes e consequentemente mais rentáveis. O avanço tecnológico permite ainda produtos cada vez mais funcionais e adaptados a necessidades e estilos de vida muito específicos, sendo isto possível com o apoio do conhecimento crescente nas áreas das ciências e saúde.

O processo de desenvolvimento atravessa diversas fases (adaptado de Silva et al, 2009) (Figura 1):

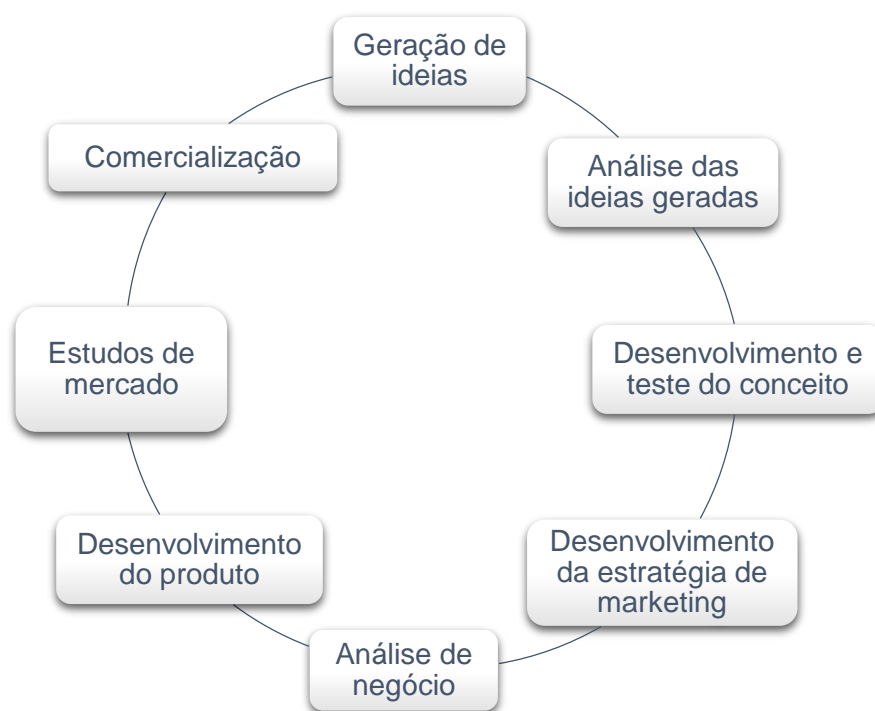


Figura 1: Processo de desenvolvimento de um produto inovador (Adaptado de Silva et al., 2009)

Assim a procura por novos produtos deve ser constante, já que não existe nenhum produto com um ciclo de vida infundável, ou seja, não pode corresponder permanentemente às exigências e necessidades do consumidor. Esta procura oferece também um potencial crescimento económico já que permite atingir novos mercados correspondentes a novas tendências dos consumidores. A constante otimização de produtos existentes permite reduzir algum custo de produção, mas não oferece uma solução positiva de crescimento.

Como possíveis origens de ideias para inovação e obtenção de novos produtos, identificam-se:

Mercado	Empresa	Diversos
<ul style="list-style-type: none"> • Identificação de necessidades através de estudos de mercado • Dados estatísticos • Troca de informação com retalhistas sobre hábitos de compra e consumo • Troca de informação com distribuidores 	<ul style="list-style-type: none"> • Interações entre a empresa e os consumidores para obter informação acerca de produtos semelhantes • Aposta na reciclagem e/ou reaproveitamento/valorização de subprodutos • Ideias espontâneas provenientes dos recursos humanos da empresa 	<ul style="list-style-type: none"> • Evolução tecnológica e científica • Novos mercados • Novos equipamentos • Alterações legislativas • Demografia

Figura 2: Possíveis origens de ideias para inovação (Fonte: Adaptado de Silva et al, 2009)

O potencial das ideias obtidas deve ainda ser corretamente avaliado, para ter uma ideia realista da sua viabilidade. Para tal, podem ser usados diversos critérios, tais como:

Facilidade de marketing – Facilidade de marketing do produto dentro da gama de produtos e marcas da empresa, bem como dos recursos disponíveis internamente para elaborar um plano de marketing estruturado.

Viabilidade técnica – Capacidade de produzir o novo produto num espaço temporal e custo razoáveis, considerando as capacidades técnicas da empresa. Avaliação da necessidade de aquisição de novos equipamentos para obter o novo produto.

Capacidade produtiva – Capacidade de manufaturar o produto atendendo às exigências de qualidade e custo necessárias. Avaliação da necessidade de aquisição de novos serviços para obter o novo produto.

Capacidade financeira – Capacidade de assumir todos os custos envolvidos no desenvolvimento de novos produtos.

Dada a dificuldade em definir um novo produto e por existirem diferentes cenários em que um produto poderá ser considerado novidade, é necessária a tipificação de novos produtos em diferentes classes (Silva et al., 2009):

Extensões de linhas de produtos – Variações de produtos já existentes em que existe uma família de produtos já posicionados no mercado de forma semelhante e onde se introduz mais um produto.

Reposicionamento de produtos já existentes – Quando uma empresa descobre uma nova aplicação para o seu produto, poderá introduzi-lo num totalmente mercado novo e diferente daquele onde o produto estava posicionado. Este reposicionamento requer uma campanha de marketing forte.

Novo tamanho/formato de um produto já existente – Nova forma de apresentar o produto aos consumidores como sendo uma vantagem relativamente ao formato já existente.

Reformulação/melhoramento de produtos – Desenvolvimento de novas fórmulas e melhoramento de produtos já existentes.

Nova embalagem para um produto existente – Aumento da conveniência para os consumidores

Produtos inovadores – Novos produtos em de alterações em produtos existentes

Produtos criativos (ou inovações radicais) – Novos produtos, sem precedentes, nunca antes existentes.

Existem ainda diversos fatores que são determinantes na aquisição e aceitação de novos produtos, que devem ser tidos em conta. Os produtos devem estar adaptados ao estilo de vida do consumidor, sendo portanto crucial oferecer a possibilidade de experimentação antes da aquisição. Os produtos deverão ser simples na sua utilização, aumentando assim a sua conveniência, conferindo mais vantagem competitiva ao oferecer claras vantagens face a outros concorrentes. Por fim, a difusão de novos produtos é altamente amplificada pela visibilidade que lhes é dada.

2.2 Enquadramento histórico e cultural do *saké*

O arroz, do qual o *saké* tradicional é produzido, é cultivado na China há mais de 7000 anos e é utilizado para produção de bebidas alcoólicas há muito tempo (JSSM e NRIB, 2011). A principal característica destas bebidas de produção asiática é a utilização de fungos, em vez de malte (como no caso da cerveja), para hidrolisar o amido em açúcares simples fermentescíveis, sendo a China o local de origem desta tecnologia (JSSM e NRIB, 2011).

Contudo, o Japão é o único país asiático que produz uma bebida cristalina e com um sabor refinado, como o *saké*, possuindo uma história de cerca de 2000 anos de contínua produção desta bebida, melhorando continuamente o seu processo produtivo (JSSM e NRIB, 2011). A forma como o *saké* foi introduzido no Japão não é clara, contudo a tradição atribui este feito a emigrantes provenientes da Coreia, por volta do século III, que possivelmente obtiveram o conhecimento na China, onde o *saké* já era consumido há muito tempo (Atkinson, 1881).

Historicamente o *saké* tem uma estreita relação com a religião, nomeadamente os rituais Shinto; nos tempos ancestrais as populações produziam *saké* e este era utilizado como oferenda para os deuses, juntamente com outros produtos agrícolas e alimentos, fazendo refeições e bebendo juntos (JSSM e NRIB, 2011). As oferendas de *saké* ainda são efetuadas na atualidade, em templos Shinto, tendo um papel essencial como presente em festivais e casamentos (JSSM: NRIB, 2011). Na manhã do dia de ano novo, famílias juntam-se e bebem *saké* em conjunto, desejando longas vidas entre si (JSSM e NRIB, 2011).

O Japão possui várias épocas distintas e diversos costumes envolvendo o consumo de *saké* associados a elas: Na Primavera, o *saké* é consumido a observar os rebentos de cerejeira, no Outono são colocadas pétalas de crisântemo nos copos de *saké* e este é consumido admirando a Lua e por fim no Inverno é comum consumir *saké* admirando a paisagem coberta de neve (JSSM e NRIB, 2011).

O *saké* também pode ser bebido quente ou frio, sendo o consumo de *saké* quente uma prática com origem no século IX, quando os aristocratas aqueciam *saké* para entreter os seus convidados (JSSM e NRIB, 2011). O aquecimento do *saké* revelou-se um importante avanço na preservação da bebida, uma vez que esta rapidamente se torna imprópria para consumo nos meses mais quentes (Atkinson, 1881). A partir do século XVIII o consumo de *saké* aquecido tornou-se comum durante todo o ano, tendo sido neste século que Kaibara Ekiken, um físico, escreveu um livro dizendo que o consumo de *saké* aquecido melhorava a circulação de *chi* (fluxo de energia) (JSSM e NRIB, 2011).

Recuando 1300 anos, existem ainda relatos do imperador e aristocratas a consumir *saké* refrescado com adição de gelo armazenado durante o Inverno, sendo considerada uma forma extravagante de consumir esta bebida (JSSM e NRIB, 2011). Desde os anos 80, um

grande número de variações de *saké* surgiu, com sabores leves e frescos, encorajando cada vez mais o seu consumo em frio (JSSM e NRIB, 2011).

2.2.1 Tipos mais relevantes de *saké*

Existem diferentes tipos de *saké* que se diferenciam pelo grau de polimento do arroz que lhe serve de substrato, pelo tipo de inóculo ou de processamento pós-fermentação e pelo seu grau de doçura. Os principais tipos são:

Ginjo – O *ginjo-shu* é um tipo de *saké* produzido a partir de grãos de arroz em que cerca de 40% das camadas exteriores foram removidas. A fermentação ocorre a temperaturas mais baixas e demora mais tempo. Pode ser adicionado 10% de *jozo-alcohol* do peso do arroz polido. É caracterizado por um aroma frutado, leve e não ácido, textura suave e bom sabor residual.

Daiginjo – É uma forma de *ginjo-shu* produzida com um arroz ainda mais polido, em que cerca de 50% das suas camadas exteriores foi removida, resultando num sabor mais forte refinado que o *ginjo-shu*.

Junmai – O *Junmai-shu* é produzido apenas a partir de arroz, *koji* e água, destacando altamente o sabor do arroz e do *koji*. Não existem condições específicas de polimento para este tipo de *saké*. Possui uma elevada acidez e pouco adocicado, revelando bastante *umami*.

Honjozo – Tem um especial ênfase no sabor, com muito pouco aroma induzido pelo envelhecimento. É consideravelmente ácido e *umami*, potenciando o sabor da comida.

Futsu-shu – Compreende a grande maioria do *saké* produzido e é caracterizado pela produção utilizando arroz polido até 70% e com adição de *jozo-alcohol* de 20% do peso do arroz polido. Tem um aroma menos pronunciado que todos os restantes tipos descritos, caracterizado por um leve aroma a caramelo resultante do envelhecimento.

Cada um destes tipos de *saké* apresenta um teor de álcool semelhante mas difere em termos de pH, Acidez, teor em glucose e densidade (Tabela 1):

Tabela 1: Valores técnicos de alguns dos principais tipos de *saké* (Fonte: Adaptado de A Comprehensive Guide to Sake, 2011).

	<i>Ginjo-shu</i>	<i>Junmai-shu</i>	<i>Honjozo-shu</i>	<i>Futsu-shu</i>
Álcool (%)	15,94	15,52	15,54	15,41
Valor do medidor de <i>saké</i> ¹	4,6	4,1	5,0	3,8
Glucose (g/100ml)	1,85	1,64	1,78	2,17
Acidez (g ácido tartárico/L) ²	1,30	1,47	1,25	1,18
Valor de aminoácidos (mg/L) ³	1,28	1,59	1,41	1,31
Valor <i>Amakara</i> ⁴	0,55	0,17	0,53	0,99

Notas: 1) Indica o peso relativo do *saké* em relação à água. Se o *saké* a 15°C pesar o mesmo que a água a 4°C, este valor é 0. *Saké* mais leve que a água é indicado com um valor positivo "+", enquanto que *saké* mais pesado que a água é indicado com um valor negativo "-". Geralmente os valores negativos estão associados a *saké* com elevados teores de açúcares, tornando-os mais pesados, ao contrário dos valores positivos que indicam bebidas mais secas.

2) Valor obtido através da titulação de uma amostra de *saké* com hidróxido de sódio, sendo expresso em termos de ácido tartárico (g/100ml). Para *saké* os valores oscilam entre 0,1-0,2 (g/100ml).

3) Valor obtido através de uma titulação de uma amostra de *saké* com formol

4) O parâmetro Valor *Amakara* - Refere-se à doçura do *saké*, ou sua ausência. É expresso pela diferença entre o teor de glucose e a acidez: Seco: <0,3, Meio seco: 0,3-1,0 inclusive, Meio doce: 1,1-1,8 inclusive e Doce: > 1,8

2.2.2 Composição do *saké*

A composição do *saké* comparativamente a outras bebidas (tabela 2):

Tabela 2: Composição do *saké* comparativamente a outras bebidas (Fonte: Adaptado de A Comprehensive Guide to Sake, 2011)

	<i>Saké</i>	Cerveja	Vinho branco
Álcool (%)	13 - 17	4 - 6	10 - 13
Glucose (g/100ml)	0,5 - 4,2	0,03 - 0,1	0,1 - 0,3
Azoto (mg/L)	700 - 1900	250 - 1000	100 - 900
Ácido glutâmico (mg/L)	100 - 250	10 - 15	10 - 90
pH	4,2 - 4,7	4,1 - 4,4	3,0 - 4,1
Ácido succínico (mg/L)	200 - 500	40 - 100	500 - 1500
Ácido málico (mg/L)	100 - 400	50 - 120	250 - 5000
Ácido tartárico (mg/L)	0	0	1500 - 4000

2.3 Microrganismos envolvidos na produção de saké

No processo fermentativo do saké, participam majoritariamente duas espécies microbianas, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae*. O fungo *Aspergillus oryzae* é responsável pela conversão do amido em açúcares simples, sendo que posteriormente a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza os açúcares simples para produzir, entre outros metabolitos, etanol.

2.3.1 *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae é um fungo filamentoso ascomicota (Tabela 3), está genomicamente bem caracterizado e é considerado um organismo seguro para produção de enzimas alimentares, visto não possuir genes que codifiquem para proteínas envolvidas na produção de aflotoxinas (Chancharopong *et al.*, 2012). Em virtude disto, é utilizado nos mais variados processos alimentares não só devido à segurança mas também devido à sua capacidade de produzir quantidades consideráveis de enzimas hidrolíticas (Chancharopong *et al.* 2012).

Tabela 3: Caracterização taxonômica de *Aspergillus oryzae* (Fonte: Adaptado de Index Fungorum, 2015)

<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) E. Conh (sinónimo: <i>A. Flavus</i> var. <i>oryzae</i>)	
Domínio	Eukaryota
Reino	Fungi
Divisão	Asmycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordem	Eurotiales
Família	Trichomaceae
Género	<i>Aspergillus</i>
Espécie	<i>oryzae</i>

Tradicionalmente a fermentação ocorre em estado sólido, contendo baixos níveis de humidade, o que potencia o crescimento do fungo e facilita a sua penetração no substrato, permitindo uma maior produção enzimática (Chancharopong *et al.*, 2012).

A fermentação em estado sólido oferece diversas vantagens em relação às fermentações convencionais (submersas), entre as quais maior simplicidade de equipamento, baixa

humidade (que previne contaminação bacteriana) e necessidade de menor quantidade de solvente para extrair as enzimas (Battaglini *et al.*, 1991).

A produção enzimática compreende na sua maioria glucoamilase e α -amilase (Kitagaki *et al.*, 2013), sendo estas produzidas assim que o fungo se propaga na superfície do substrato. A qualidade do *saké* está diretamente relacionada com o equilíbrio destas duas enzimas (Kitagaki *et al.*, 2013).

Para o processo de fermentação do arroz, as principais enzimas produzidas por *Aspergillus oryzae* são a aspergillus pepsina, mucor pepsina, oryzina, α -amilase, glucoamilase e γ -glutamyltransferase, as quais se encontram descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Principais enzimas produzidas por *Aspergillus Oryzae* (Adaptado de Brenda, 2015).

Nome	<i>Aspergillus pepsina</i>	<i>Mucor pepsina</i>	Oryzina	α -amilase	Glucoamilase	γ -glutamyltransferase
Nome alternativo	Protease ácida	Protease ácida	Protease alcalina	---	Glucano 1,4- α -glucosidase	---
pH	Estável entre 3 - 6; inativada <2 e >7	Ótimo a 3,2	5 - 10 (ótimo a 7,5 - 8,8)	Ótimo a 4	Ótimo entre 4 e 4,5	Ótimo a 8,5
Temperatura ótima	35°C	55°C	40°C	37-50°C	50-60°C	30°C
Substratos	Proteínas (em meio aquoso)	Proteínas (em meio aquoso)	Proteínas	Amido (em meio aquoso)	Amido (em meio aquoso)	Péptidos (contendo glutamato)
Ligação hidrolisada	Peptídica	Peptídica	Peptídica	α -(1,4)	α -(1,4) (1,6) (1,3)	-
Produtos	Péptidos	Péptidos	Péptidos	Malto-oligossacáridos	Glucose	Ácido glutâmico e péptidos

2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura ascomicota e a mais utilizada em processos de fermentação alcoólica. Trata-se de uma levedura que não produz amido, sendo também incapaz de o hidrolisar, pelo que é necessária a degradação do amido presente em diversos substratos em açúcares mais simples, para que possa ser utilizado.

Tabela 5: Caracterização taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae* (Fonte: Adaptado de Index Fungorum, 2015)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> meyen ex. E. C. Hansen	
Domínio	Eukaryota
Reino	Fungi
Divisão	Asmycota
Classe	Saccharomycetes
Ordem	Saccharomycetales
Família	Saccharomycetaceae
Género	Saccharomyces
Espécie	<i>S. cerevisiae</i>

Durante a fermentação alcoólica, *S. cerevisiae* converte os açúcares fermentescíveis em etanol, produzindo igualmente o elevado número de outros compostos voláteis responsáveis por diversos aromas, tais como ácidos gordos, álcoois superiores e ésteres (Russouw *et al.*, 2008).

S. cerevisiae apresenta, no entanto, alguma sensibilidade ao etanol. Este atua como um inibidor, interferindo no transporte de nutrientes para o interior da membrana celular, uma vez que os teores alcoólicos do saké são elevados, na sua produção

São utilizadas diversas estirpes de *S. cerevisiae* com características muito específicas que as tornam ideais para produção desta bebida entre as quais (Kitagaki *et al.*, 2013):

Ausência de produção de espuma – a estirpe não adere nem produz uma grande quantidade de espuma, reduzindo o custo de produção do saké. Sendo que a mistura principal ocupa 70% do espaço em que está a ocorrer a fermentação, a ausência de espuma é de extrema importância para economizar espaço.

Ausência da produção de ureia – A ureia conduz à produção de carbamato de etilo, um carcinógeno. Este composto forma-se através de uma reação química entre a ureia e o etanol (Mirvish, 1968).

Produção de diversos compostos aromáticos – Destes compostos, dos mais relevantes é o caproato de etilo (ou hexanoato de etilo) que confere um perfil mais aromático ao saké, nomeadamente um aroma semelhante a maçã.

Baixa produção de piruvato residual - Estirpe com uma produção reduzida de piruvato. O piruvato residual durante a fermentação alcoólica conduz à produção de alguns compostos capazes de conferir aromas indesejados ao produto final, tais como diacetilo e acetaldeído.

Adaptação a condições de anaerobiose - Estirpe mais versátil, sendo capaz de se desenvolver em condições de anaerobiose.

Resistência a baixo pH - Valores de pH baixos favorecem um ambiente hostil para a maioria dos microrganismos, incluindo os patogênicos. Sendo esta levedura resistente, ela propaga-se e sobrevive na mistura principal sem constrangimentos

Resistência ao etanol - Algumas estirpes apresentam resistência a elevadas concentrações de etanol. Durante a produção de *saké*, é produzido aproximadamente 18-20% (v/v) de etanol. Esta concentração elevada é atingida pela sacarificação e fermentação simultânea e pela capacidade de produzir elevadas quantidades de etanol de algumas estirpes. Em elevadas concentrações de álcool ocorre a lise celular, libertando diversos compostos contidos no meio intracelular, como aminoácidos, deteriorando a qualidade do produto final.

Capacidade fermentativa melhorada - Estirpe capaz de uma melhor fermentação.

Atualmente, existem várias estirpes no mercado que foram especificamente selecionadas como boas produtoras com base nas características acima descritas (Tabela 6):

Tabela 6: Principais estirpes usadas na produção de *saké* (adaptado de Kitagaki *et al.*, 2013).

Fenótipo da estirpe	Método de reprodução	Mutação	Organismo geneticamente modificado	Referência
Ausência da produção de espuma	Não aderência de espuma	AWA1	Não	Ouchi & Akiyama 1971
Resistente ao etanol	Resistência ao etanol	Gene resistente ao stress?	Não	Hara <i>et al.</i> 1976
Superprodução de caproato de etilo	Resistência à cerulenina	FAS2	Não	Ichikawa <i>et al.</i> 1991
Superprodução de acetato de isoamilo	Resistência a análogo da leucina	Desconhecida	Não	Ashida <i>et al.</i> 1987
Superprodução de acetato de isoamilo	Monofluoroacetato de isoamilo	Deficiência de esterase?	Não	Watanabe <i>et al.</i> 1993
Superprodução de acetato de isoamilo	Resistência à pregnenolona	Superexpressão de ATF2	Não	Tsutsumi <i>et al.</i> 2002
Superprodução de acetato de isoamilo	Transformação e seleção por auxotrofia	ATF1	Próprio ¹	Hirosawa <i>et al.</i> , 2004
Não produtora de ureia	Crescimento em meio CAO	CAR1	Não	Kitamoto <i>et al.</i> , 1993

Produtora de pigmento vermelho	Falta de crescimento em meio pobre em adenina	Gene de síntese de adenina	Não	Ouchi <i>et al.</i> , 1983
Superprodução de tirosol	Resistência a análogo da tirosina	Desconhecida	Não	Koseki <i>et al.</i> , 2004
Superprodução de tirosol	Resistência a etanol e síntese de triptofano defeituosa	Transportador de tirosina?	Não	Soejima <i>et al.</i> , 2012
Capacidade fermentativa melhorada	Resistência a clotrimazol	PDR1/PDR3	Não	Mizoguchi <i>et al.</i> , 1999
Superprodução de álcool β-fenetílico	Resistência a análogo da fenilalanina	TYR1	Não	Fukuda <i>et al.</i> , 1991
Superprodução de malato	Resistência a análogo do succinato	Desconhecida	Não	Aikawa <i>et al.</i> , 1992
Superprodução de malato	Baixa assimilação de sucrose	Desconhecida	Não	Asano <i>et al.</i> , 2001
Superprodução de malato	Morfologia mitocondrial	FIS1	Sim	Kitagaki <i>et al.</i> , 2008
Baixa produção de piruvato	Resistência a um inibidor de transporte mitocondrial	Transporte mitocondrial de piruvato?	Não	Horie <i>et al.</i> , 2010
Superprodução de péptidos	Resistência num meio rico em péptidos e cobre	Transportador de péptidos?	Não	Yamada <i>et al.</i> , 2005
Superprodução de caproato de etilo	Transformação e substituição de genes de dois passos	FAS2	Próprio ¹	Akada <i>et al.</i> , 1999
Superprodução de caproato de etilo	Reprodução de haplóides	Desconhecida	Não	Yoshida <i>et al.</i> , 1993
Superprodução de caproato de etilo	Fusão de protoplastos	Desconhecida	Não	Hirata <i>et al.</i> , 1992

Nota: 1) Alterações genéticas através de reprodução seletiva e/ou mutações espontâneas.

2.4 Substratos

2.4.1 Arroz

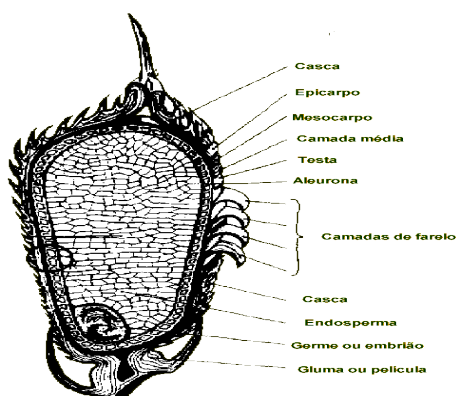


Figura 3: Constituição do grão de arroz (Fonte: Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

O arroz constitui o substrato necessário aos microrganismos durante o processo fermentativo do *saké*, em que o amido é hidrolisado sendo convertido em unidades mais simples e utilizado pelas leveduras para produzir etanol.

O grão de arroz é heterogéneo (Figura 3) na sua quantidade de amido. A quase totalidade deste está concentrada na camada mais interior, o endosperma. A amido do arroz consiste em amilose e amilopectina

(Kitagaki *et al.*, 2013). A amilose é constituída por α -1,4 glucose e a amilopectina contém ramos de α -1,6 glucose (Kitagaki *et al.*, 2013).

Os diversos tipos de arroz existentes apresentam diferenças, sobretudo na constituição do amido, variando a proporção de amilose e amilopectina.

O grão inteiro tem de ser processado antes de estar apto para ser utilizado como substrato na fermentação, pelo processo ilustrado na Figura 4.

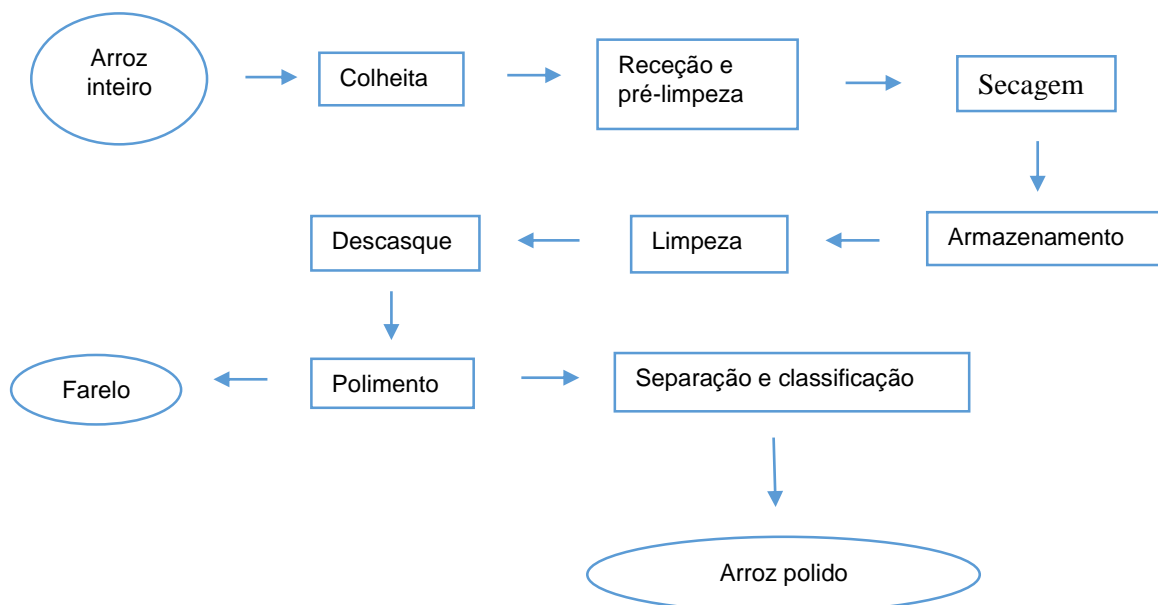


Figura 4: Esquema das etapas do processamento do grão de arroz para produção de sake (Fonte: Adaptado de Ludwig, 2004)

As características do arroz em si não são de extrema importância no sabor final da bebida, são sim cruciais a sua capacidade de absorver água no processo de vaporização e a quantidade de açúcares simples resultantes da hidrólise do amido, que vão influenciar o processo fermentativo por parte das leveduras (Yoshizawa *et al.*, 2004). As variedades de arroz de grão curto são mais adequadas para este processo, visto que as variedades caracterizadas por grão longo produzem menos açúcares após a hidrólise e podem conferir odores indesejados no produto final (Yoshizawa *et al.*, 2004).

O principal composto de interesse no arroz, para efeitos fermentativos, é o amido, contudo as camadas exteriores do grão inteiro contém diversos outros componentes de relevância considerável para a proliferação de *A. oryzae* e *S. cerevisiae*, como proteínas, lípidos, vitaminas e minerais (JSSM e NRIB, 2011). Uma quantidade excessiva destes compostos

aumenta a velocidade do processo fermentativo, provocando uma fermentação desequilibrada, que degrada a cor, aroma e sabor do *saké* (JSSM e NRIB, 2011).

Para contariar este efeito, no polimento do arroz, as camadas exteriores são removidas, reduzindo os teores dos compostos referidos. Para medir o nível de polimento utiliza-se o termo *seimai-buai*, mais precisamente este termo refere-se ao peso do arroz polido como uma percentagem do peso do grão de arroz inteiro (JSSM e NRIB, 2011). O polimento é efetuado com recurso a ação mecânica abrasiva por parte de equipamento especializado.

No caso do arroz utilizado para produção de *saké*, são removidas entre 30 e 70% das camadas exteriores (resultando num valor de *seimai-buai* de 70 a 30%), consequentemente um valor de *seimai-buai* mais baixo, corresponde a um maior custo de produção do *saké*, no entanto resulta num produto equilibrado, aromático, suave e com um sabor residual agradável. Imagem explicativa do cálculo do valor de *seimai-buai* e diferentes níveis de polimento (Figura 5 e 6):

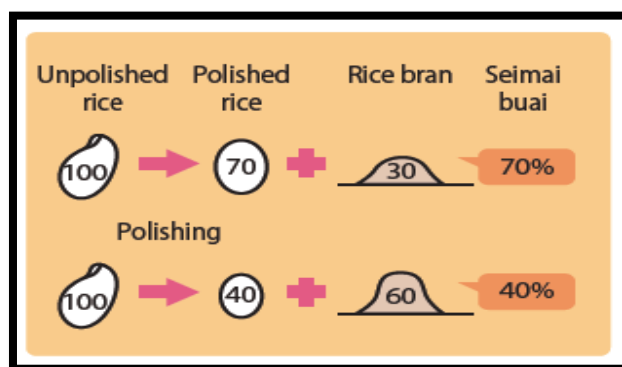


Figura 5: Cálculo do valor de *seimai-buai* (Fonte: Adaptado de A Comprehensive Guide to Sake, 2011)

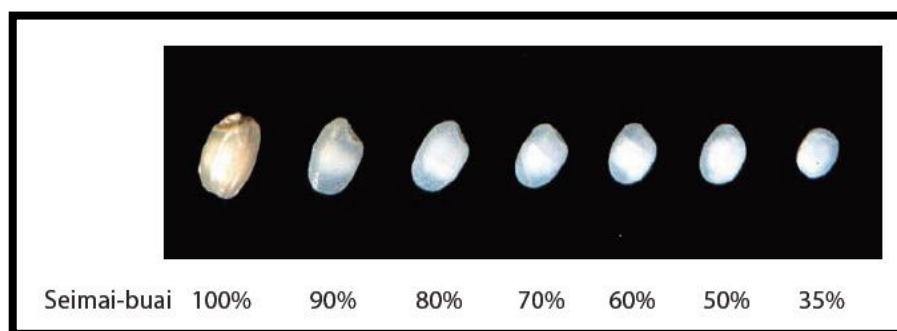


Figura 6: Grãos de arroz com diferentes níveis de polimento (Fonte: Adaptado de A Comprehensive Guide to Sake, 2011)

O arroz carolino é tipo de arroz português mais similar ao mais usado na produção de *saké* no Japão dada a sua elevada percentagem de amilopectina, que lhe confere uma enorme capacidade de absorção de água (Tabela 7).

Tabela 7: Composição do arroz carolino cru (Fonte: Adaptado de Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2015)

Componentes	por 100 g*
Energia, kcal	363
Energia, kJ	1517
Água, g	10,7
Proteína, g	7,4
Gordura total, g	0,5
Total de Hidratos de Carbono disponíveis, g	79,6
Total de Hidratos de Carbono expresso em monossacáridos, g	87,6
Mono+dissacáridos, g	0
Ácidos orgânicos, g	0
Álcool, g	0
Amido, g	79,6
Oligossacáridos, g	0
Fibra alimentar, g	2,2
Ácidos gordos saturados, g	0,1
Ácidos gordos monoinsaturados, g	0,1
Ácidos gordos polinsaturados, g	0,2
Ácidos gordos trans, g	0
Ácido linoleico, g	0,2
Colesterol, mg	0

É de notar que após o processo de vaporização a composição sofre ligeiras alterações sobretudo porque o teor em água aumenta, mas para efeitos fermentativos o interesse recai quase inteiramente sobre o amido, e este é retido na sua totalidade.

2.4.2 Castanha

No presente trabalho, o principal substrato utilizado na produção tradicional, foi substituído por castanha, de forma a avaliar o seu potencial fermentativo e otimizá-lo.

A indústria da castanha produz uma variedade relativamente grande de subprodutos, processando, sobretudo, o fruto, rico em amido, para fins alimentares e transformação. O

amido presente na castanha tem um teor de amilose de cerca de 21,5% (Demiate *et al*, 2001). É ainda de notar que a castanha é isenta de glúten (Braga, 2014).

Na indústria alimentar, subprodutos como a casca e o ouriço exterior, não possuem qualquer valor ou utilidade (Braga, 2014), contudo do processamento e transformação da castanha resultam pedaços, unidades de qualidade inferior que podem ser reutilizados. O objectivo principal é o reaproveitamento de unidades de menor interesse e/ou consideradas subprodutos resultantes do processamento de castanha, sendo estas unidades de calibre inferior e pedaços partidos.

Apesar de os restantes componentes da castanha inteira não serem utilizados na indústria alimentar, podem ser utilizados noutro tipo de indústrias. A casca (20% do peso total da castanha) e o ouriço são geralmente utilizados como biocombustível (Braga, 2014), podendo conduzir a uma maior sustentabilidade de todo o processamento. Por outro lado, os pedaços podem ser reutilizados para rações animais, o que acrescenta um valor muito baixo a este produto, pelo que a indústria procura encontrar novas formas de o valorizar.

A castanha encontra-se no mercado sob várias formas de produto sendo a mais comum a castanha fresca (muito sazonal) e a castanha congelada.

Foi utilizada castanha pilada congelada, processada segundo o esquema da Figura 7 (Braga 2014):

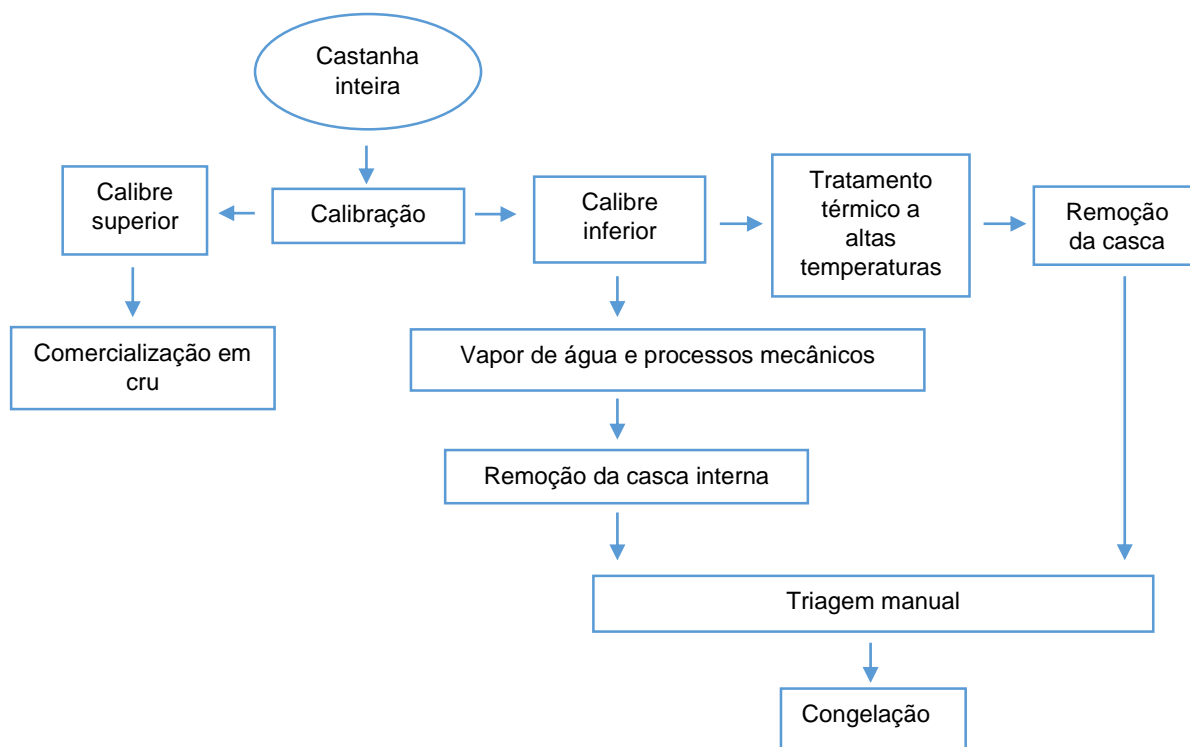


Figura 7: Esquema das etapas de processamento da castanha (Fonte: Adaptado de Braga, 2014).

Para além de rica em amido, a castanha tem uma percentagem de gordura mais elevada que o arroz e menor percentagem de proteína (Tabela 8). Para além disso, a castanha apresenta uma fração de hidratos de carbono fermentescíveis (mono e dissacáridos) e uma maior fração de fibras alimentares.

Tabela 8: Composição nutricional da castanha pilada (Fonte: Adaptado de Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2015).

Componentes	por 100 g*
Energia , kcal	324
Energia , kJ	1355
Água, g	9,9
Proteína, g	5,1
Gordura total, g	2,0
Total de Hidratos de Carbono disponíveis, g	70,0
Total de Hidratos de Carbono expresso em monossacáridos, g	76,1
Mono+dissacáridos, g	17,2
Ácidos orgânicos, g	0
Álcool, g	0
Amido, g	52,8
Oligossacáridos, g	0
Fibra alimentar, g	11,3
Ácidos gordos saturados, g	0,4
Ácidos gordos monoinsaturados, g	0,7
Ácidos gordos polinsaturados, g	0,7
Ácidos gordos trans, g	0
Ácido linoleico, g	0,6
Colesterol, mg	0

Para além dos pedaços partidos e unidades de qualidade inferior, existem outros subprodutos resultantes do processamento da castanha que são também utilizados em diversas aplicações (Figura 8) (Braga, 2014).

Folhas	Cascas	Ouriço
<ul style="list-style-type: none"> • Indústria farmacêutica (efeito protetor na diabetes) • Atividade antibacteriana e alelopática • Cosmética (Aplicação tópica para tratamento e prevenção de danos solares) 	<ul style="list-style-type: none"> • Biocombustível • Atividade antioxidante • Adsorvente de metais • Substituto de fenol em colas • Indústria de peles (Aproveitamento de taninos para substituir sais de crómio) 	<ul style="list-style-type: none"> • Biocombustível • Atividade antioxidante • Fonte de fibra

Figura 8: Aplicações de vários subprodutos da indústria da castanha (Fonte: Adaptado de Braga, 2014).

2.5 Koji

O termo *koji* refere-se a uma mistura de esporos de microrganismos, geralmente do género *Aspergillus*, com um substrato amiláceo, que é usado como inóculo na produção de alimentos fermentados como o *saké*, o miso ou o molho de soja.

Para produzir *koji*, procede-se à inoculação do substrato (normalmente cozido a vapor) com esporos de *Aspergillus oryzae*. Algum tempo após a inoculação, os esporos desenvolvem-se espalhando filamentos do fungo por todo o substrato, começando depois a esporular. O *koji* considera-se pronto para iniciar o processo fermentativo quando todo o substrato se encontra coberto de filamentos e esporos do fungo (Hutkins, 2006), estado caracterizado por uma tonalidade verde escura. Quando o fungo se propaga maioritariamente na superfície do substrato, é favorecida a produção de enzimas e vitaminas, quando o fungo penetra no interior do substrato, ocorre uma degradação mais profunda do grão e é promovida uma melhor fermentação (JSSM: NRIB, 2011).

Este processo é considerado uma fermentação em estado sólido e é a mais adequada, já que a baixa humidade permite a penetração do fungo por todos os níveis do substrato e potencia a sua produção enzimática, comparativamente com uma fermentação submersa (Chacharonpong *et al.*, 2012).

Durante o seu desenvolvimento, *Aspergillus oryzae* produz uma grande quantidade e variedade de enzimas hidrolíticas de forma secretória (Machida *et al*, 2008) que estão contidas no *koji*, sendo estas essenciais para a hidrólise do amido presente no substrato.

2.6 Saké

2.6.1 Esquema geral de produção

As principais fases de produção de saké encontram-se esquematizadas na Figura 9.

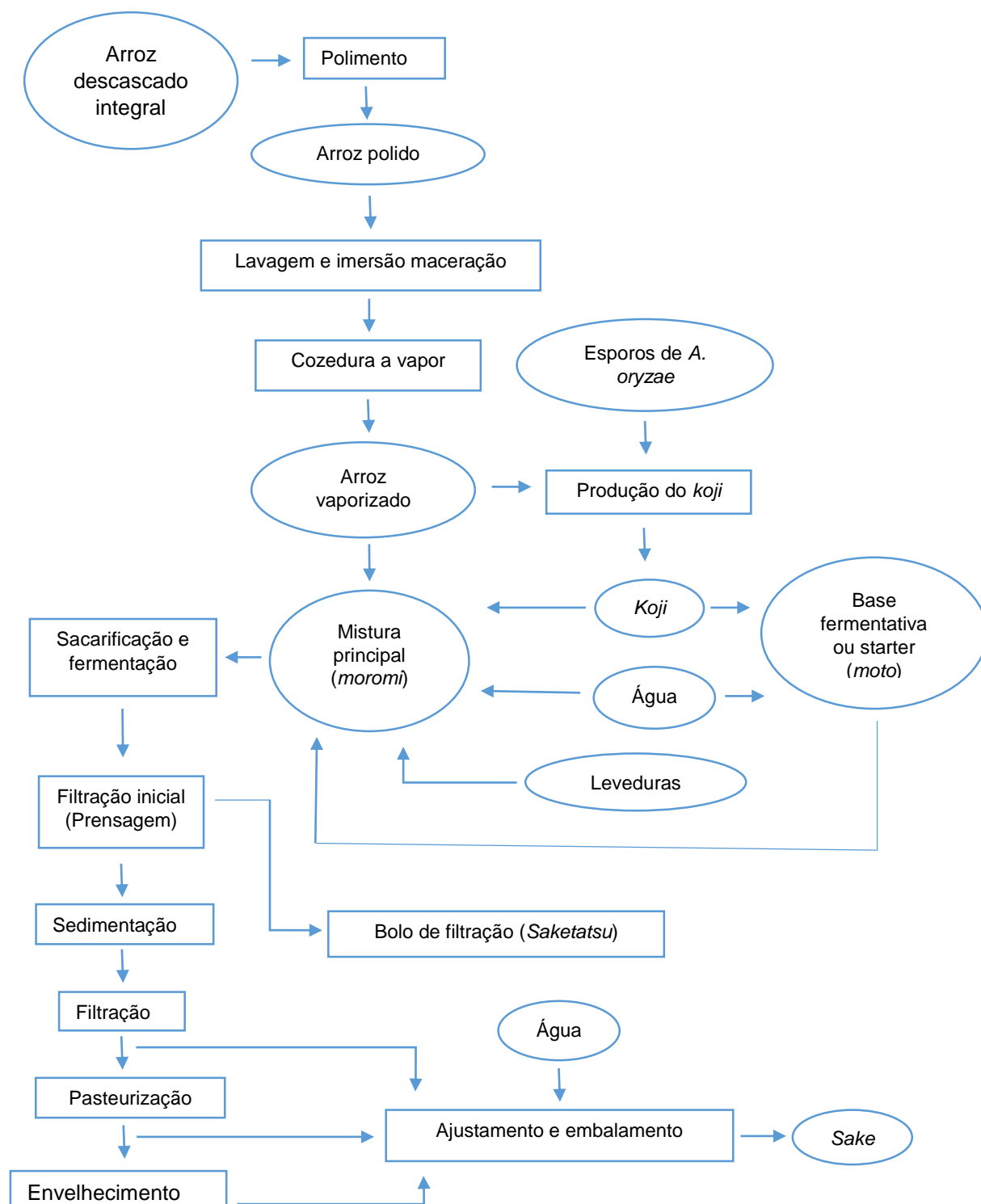


Figura 9: Esquema das principais fases de produção do saké (Fonte: Adaptado de A Comprehensive Guide to Sake, 2015).

2.6.2 Descrição das etapas de produção

2.6.2.1 Polimento

Consiste na remoção das camadas exteriores do grão de arroz (Figura 9), que são ricas em lípidos, proteínas e diversos minerais que poderiam conferir sabores indesejados ao produto final. Cerca de 30% da camada externa do grão é removida, restando 70% da massa central (JSSM e NRIB, 2011).

2.6.2.2 Lavagem, imersão e cozedura

Após o polimento (Figura 9), o arroz é lavado para remover o restante farelo e outros resíduos, sendo deixado em imersão. No processo de lavagem, é perdida cerca de 1-3% da massa total do grão, absorvendo 7%-17% do seu peso em água (Yoshizawa *et al.* 2004). A imersão pode durar desde algumas horas até um dia, ocorrendo uma absorção de água de 25-30%, necessária para a cozedura. O arroz é então cozido a vapor durante uma hora.

O arroz vaporizado é menos húmido e menos pegajoso, tornando-o ideal para prosseguir o processo de produção de *saké* (JSSM e NRIB, 2011).

Durante o processo de cozedura o arroz absorve mais 7-12% do seu peso em água, totalizando 35-40% (Yoshizawa *et al.* 2004). Ocorre ainda neste processo alguma gelatinização do amido, abundante no grão de arroz, e desnaturação de proteínas. Estas transformações potenciam a hidrólise causada pelas enzimas presentes no *koji* (Yoshizawa *et al.* 2004).

2.6.2.3 Produção do koji

Na fase da produção propriamente dita, o arroz cozido a vapor é inoculado com esporos de *Aspergillus oryzae*. Este passo é necessário para converter o amido presente no grão de arroz em açúcares mais simples, permitindo a sua utilização como substrato pelas leveduras, posteriormente.

Após a inoculação, os esporos germinam e espalham hifas por toda a superfície do substrato, penetrando no seu interior. Inicia-se a produção enzimática, sendo que as enzimas excretadas pelo fungo ficam contidas no *koji*.

Durante a produção de *koji* (Figura 9), o fungo produz uma grande quantidade de enzimas responsáveis pela hidrólise do amido e degradação de proteínas em unidades mais simples,

aminoácidos e péptidos. As enzimas produzidas são mais de 50, sendo de especial relevância a α -amilase, as glucoamilases e as proteases ácidas (Yoshizawa *et al.* 2004).

As enzimas produzidas são fortemente influenciadas pelas condições de cultura. A amilase é produzida a 40°C enquanto a 30°C é favorecida a secreção de proteases (Yoshizawa *et al.* 2004).

O fungo apresenta a sua maior atividade a 36°C e cessa-a na totalidade a valores superiores a 45°C, assim sendo a temperatura da cultura deverá ser mantida por volta dos 30°C e a uma humidade relativa de 50-80% (JSSM e NRIB, 2011). A cultura deve ser mexida de forma a uniformizar o mais possível a cobertura com esporos e as gotículas de água devem ser removidas.

Diferentes métodos de produção de *koji* (Yoshizawa *et al.*, 2004):

Tradicional – Após cozinhar o arroz, este é transferido para uma câmara de cultura de *koji*, a 26-28°C e a uma humidade relativa de 80-90%, sendo introduzido em prateleiras de madeira no chão da divisão, onde a temperatura é mais baixa. É então coberto com tecido durante 2-3h, para estabilizar a temperatura.

Quando a temperatura se encontra estabilizada em conformidade com a da câmara, o arroz é inoculado com esporos de *A. oryzae* com uma espécie de peneira. O “*takenoji*” é utilizado numa proporção de 60-100g por 100 kg de arroz. A mistura é mexida distribuir os esporos, sendo depois colocada numa travessa e coberta com tecido. A temperatura no final desta fase é de 31-32°C.

Ao fim de algum tempo, 10-12h após a inoculação, é produzido calor pela respiração do fungo filamentoso e massas de micélios brancos aparecem na superfície do substrato, acompanhadas de um forte odor. Os grãos de arroz são mexidos e partidos, libertando o calor, sendo dispostos da mesma forma que no início da preparação e cobertos com tecido, sendo a temperatura no final desta fase é de 31-32°C.

Passadas 24h após a inoculação a o arroz é separado em grelhas, libertando o calor e permitindo a passagem de ar fresco, em porções de 1.5kg e empilhadas em colunas de seis unidades. As temperaturas antes e depois desta operação são, respetivamente, 33 e 31°C. Após 5-6h verifica-se um gradiente de temperatura entre as grelhas superiores e inferiores, pelo que a sua posição é ajustada, sendo a temperatura de 32-34°C.

Para cada nível, 6-8h após a separação em travessas, a cultura é mexida libertando dióxido de carbono e reduzindo a temperatura de 35-36°C para 33-35°C. Os grãos

são recolhidos em pilhas e as grelhas mudadas novamente. Passadas 6h desta operação, os micélios cobrem 80% da superfície dos grãos, sendo necessário mexer novamente a cultura, reduzindo a temperatura de 37-39°C para 36-38°C.

Algumas horas após a segunda operação de mistura a temperatura atinge 41-43°C, sendo as grelhas de novo invertidas e a sua posição modificada. Quando a qualidade do *koji* é considerada adequada, este é espalhado no solo da câmara e mexido para remover humidade residual e reduzir a temperatura, sendo depois recolhido e removido da câmara de cultura. O *koji* obtido deve apresentar uma tonalidade esbranquiçada, tendo o crescimento do fungo parado antes da esporulação mas após o seu crescimento no interior e superfície do grão. Os grãos devem estar firmes e separados, sem qualquer aglomeração.

Preparação industrial simplificada – O método industrial mais usual envolve a utilização de travessas de dimensão muito superior às convencionais, contendo até 15kg de arroz. Para regular a temperatura e gases durante a produção do *koji*, as travessas são feitas de uma espécie de malha, permitindo um fluxo de ar contínuo que expulsa gases indesejáveis e reduz a temperatura, impedindo o aumento da humidade e crescimento de outros microrganismos.

2.6.2.4 Preparação da base fermentativa ou *starter* (*moto*)

Mistura de substrato e *koji* já preparado, que atua como uma base fermentativa (*moto*) (Figura 9) para a mistura principal. Esta mistura permite iniciar rapidamente o processo de sacarificação e favorece um meio mais ácido, que suprime o crescimento microbiano indesejado.

Existem diferentes métodos de produção do *starter* (Yoshizawa *et al.*, 2004):

Método tradicional “Yamahai-moto” – Uma porção de *koji* e água (30kg de *koji* e 100L de água) são introduzidos inicialmente num tanque a 7-8, durante 3-4 dias. A temperatura eleva-se gradualmente, com as operações de agitação diárias, enquanto ocorre a hidrólise do amido. A mistura é aquecida diariamente 0.5-1°C com a introdução de água quente ou colocando uma placa de aquecimento no fundo do tanque. Este aquecimento é efetuado durante 10-15 dias, até a temperatura se situar nos 14-15°C.

Durante este período ocorrem diversas mudanças na microbiota da mistura, cronologicamente:

1 - Bactérias redutoras de nitratos como *Pseudomonas sp.* e *Achromobacter sp.* provenientes do *koji* e da água.

2 - A toxicidade do nitrito produzido por estas bactérias induz rapidamente a morte de vários tipos de leveduras, 2-3 dias após o início da fermentação.

3 - Bactérias produtoras de ácido láctico, como *Leuconostoc mesenteroides* var. *sake* e *L. sakei*.

4 - As bactérias anteriores sucumbem perante as elevadas concentrações de açúcares e acidificação do meio promovido por leveduras do *saké* (*S. cerevisiae*).

Quando a temperatura atinge os 15°C, os nitratos desaparecem na totalidade e permanecem apenas *S. cerevisiae* na mistura. Modernamente, as leveduras são cultivadas separadamente da mistura até fase exponencial de crescimento, inoculando-se posteriormente a mistura de *koji* e água com uma proporção até 10⁵-10⁶ células por grama.

Dois a três dias após a inoculação as leveduras iniciam o processo fermentativo, estando a 18-20°C, reduzindo os açúcares a etanol. A mistura é mais tarde arrefecida para inibir os efeitos tóxicos do etanol, que causariam a morte de algumas leveduras.

Método industrial “Sokoju-moto” - Este método consiste na adição de ácido láctico à mistura (600-700mL por 100L de água), reduzindo o pH para 3.5-3.8. Este método reduz o tempo de preparação do *starter*, sem necessidade do aquecimento gradual.

O crescimento microbiano é inibido pelo ácido láctico, tornando-se possível o crescimento de leveduras selvagens em conjunto com as domesticadas, sendo até possível a sua dominância na cultura. Assim sendo, é necessário inocular uma elevada quantidade de biomassa de levedura domesticada de modo a garantir o domínio desta no processo fermentativo.

Método de aquecimento “Ko-on-toka moto” - Este método consiste numa variação do método industrial. Porções de *koji*, arroz e água são misturadas e aquecidas durante algumas horas, proporcionando um mosto com concentrações elevadas de açúcares simples, provenientes da degradação do amido. A mistura é

então inoculada com leveduras. Exemplo: 220L de água, 120kg de substrato, 60kg de *koji*, aquecimento de 55-60°C durante 5-6 horas, adição de ácido láctico, arrefecimento rápido, adição de leveduras com 10^5 - 10^6 células/g de mistura quando a temperatura atinge 25°C.

2.6.2.5 Sacarificação e fermentação

A base fermentativa é introduzida num recipiente, adicionando-se sucessivamente novas quantidades de *koji*, substrato e água, durante um período de quatro dias (Figura 9). Nos dias seguintes à preparação do *moromi* (3 dias restantes), são feitas 3 adições, uma por cada dia, sendo o seu volume sensivelmente duplicado de cada vez. Após as adições, o *moromi* é deixado a fermentar durante um período que varia de 15 dias até um mês (Yoshizawa *et al.* 2004). Caso a totalidade dos ingredientes fosse adicionada num passo único as leveduras ficariam demasiado diluídas, prolongando o tempo necessário para atingir a densidade adequada para uma fermentação alcoólica adequada e permitiria o crescimento de microrganismos indesejados, que poderiam cessar o processo fermentativo (JSSM e NRIB, 2011). Na Figura 10 encontram-se representadas as temperaturas previstas durante a fase de adição e até ao final da fermentação.

Após a primeira adição de substrato, *koji*, água e base fermentativa (*moto*) a temperatura é de 12-14°C e a fermentação inicia-se no segundo dia. A mistura fica mais diluída nesta fase, no entanto existem inibidores suficientes (por exemplo, ácido láctico) para prevenir a contaminação externa. No segundo dia, procede-se a nova adição de ingredientes numa quantidade semelhante à primeira adição, sendo que a mistura fica novamente diluída, reduzindo de novo a inibição do crescimento de microrganismos, razão pela qual a temperatura é reduzida para 9-10°C (JSSM e NRIB, 2011).

A terceira adição procede da mesma forma que as restantes, e de novo o meio é diluído, sendo necessária nova redução da temperatura, para 7-8°C (JSSM e NRIB, 2011).

A fermentação estende-se por um período de duas semanas a um mês, sendo que a temperatura aumenta até um valor de 15-18°C até ao final da fermentação, facilitando a sacarificação e fermentação (JSSM e NRIB, 2011).

O teor de álcool atinge os 17-20% (JSSM e NRIB, 2011) sendo por vezes feitas correções com adições de álcool. Nesta fase a produção de álcool é simultânea à sacarificação, contrariamente ao que acontece na produção do *moto*, em que é sucessiva, permitindo elevados teores alcoólicos no produto final (JSSM e NRIB, 2011).

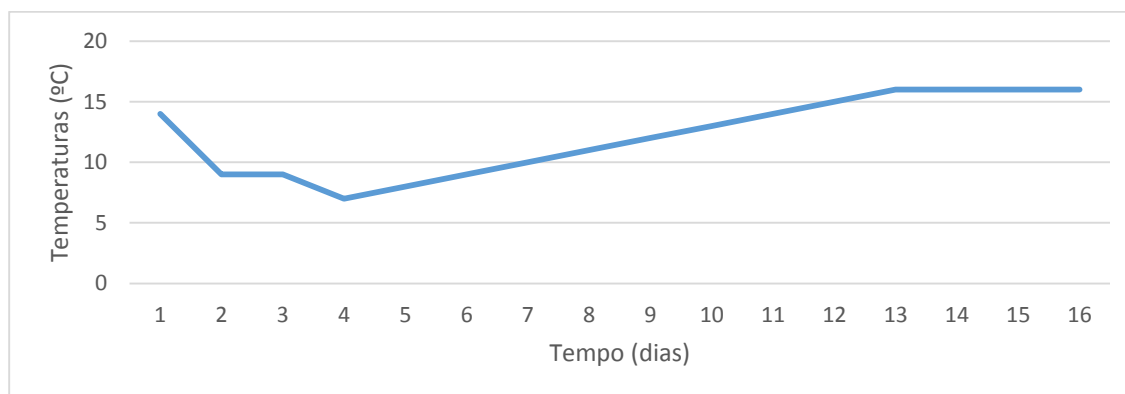


Figura 10: Temperaturas previstas da mistura principal na fermentação
(Fonte: Adaptado de A Comprehensive Guide to Sake, 2011).

2.6.2.6 Filtração inicial (Prensagem)

A mistura principal (*moromi*) é filtrada (Figura 9) utilizando um pedaço de tecido, envolvendo a mistura em tecido e aplicando pressão através de uma máquina para obter um maior rendimento. Deste processo resulta deste processo um bolo de filtração denominado *saketatsu*, altamente nutritivo. Este bolo contém ainda 8% do seu peso em álcool e pode ser utilizado como matéria-prima para diversos produtos alimentares tais como *shochu* (bebida destilada tradicional japonesa) e para produção de *pickles* (JSSM e NRIB, 2011).

2.6.2.7 Sedimentação e filtração

Após a filtração inicial (Figura 9) o líquido encontra-se ainda muito turvo, pelo que é deixado a baixa temperatura, promovendo a precipitação das partículas em suspensão. A parte do líquido agora menos turvo é transferida para outro recipiente para uma nova filtração. Durante esta filtração pode ser utilizado carvão ativado para alguma remoção de cor, ajuste de aroma e controlo do processo de envelhecimento (JSSM e NRIB, 2011).

Apesar deste processo de filtração originar um líquido cristalino, este pode perder alguma da sua transparência durante o armazenamento, devido à precipitação de proteínas dissolvidas no *saké*. Para corrigir este processo, podem ser utilizados taninos ou sílica, que removem estas proteínas (JSSM e NRIB, 2011).

2.6.2.8 Pasteurização

Grande parte do *saké* sofre um processo de pasteurização, a 60-65°C antes do armazenamento. A pasteurização torna o líquido estável microbiologicamente ao mesmo

tempo que inativa quaisquer enzimas. Se a atividade enzimática continuar, desenvolve-se alguma sensação de doce e altera-se o aroma. A pasteurização pode ser efetuada de novo quando o *saké* já se encontra engarrafado (JSSM e NRIB, 2011).

2.6.2.9 Envelhecimento

O aquecimento durante o processo de pasteurização pode alterar o aroma do *saké*, deixando-o com um sabor pouco refinado. Assim sendo, o *saké* pode ser deixado a envelhecer (Figura 9) durante seis meses, até um ano (JSSM e NRIB, 2011).

2.6.2.10 Ajuste e embalagem

O teor alcoólico do *saké* envelhecido atinge os 17-20%, sendo este um teor demasiado elevado para consumo em refeições. Os produtores podem decidir então adicionar água para corrigir o teor (Figura 9) para um valor de 15% antes do engarrafamento (JSSM e NRIB, 2011).

2.7 Análise sensorial

A análise sensorial pode ser descrita como uma área científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações às características dos alimentos e materiais, tal como são percebidos pelos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição (IFT, 1981).

A análise sensorial procura responder a três tipos de questões (Noronha, 2003):

Descrição – A que é que sabe o produto? Quais são as características sensoriais percebidas? De que modo a qualidade do produto difere de outro produto? Quais são as consequências de uma modificação no processo, formulação, embalagem ou condições de armazenamento nos atributos do produto?

Discriminação – Será que o consumidor nota a diferença? Será que o consumidor deteta isto? Quantos consumidores detetariam esta diferença? Qual a magnitude da diferença? Será que isto é igual aquilo?

Preferência ou hedónico – Quantas pessoas gostam deste produto? O produto é aceitável? Este produto é tão bom como o concorrente? Será que este produto é melhor que o anterior? Quais são as características mais apreciadas? Será o preferido pelo consumidor?

2.8 Objetivos

Atendendo à crescente apetência dos consumidores por novos produtos alimentares, pretendeu-se com este trabalho produzir uma nova bebida com base no método tradicional de produção de *saké*, usando como substrato um produto português com elevado conteúdo em amido – a castanha. Procurou-se ainda utilizar subprodutos da indústria da castanha como forma de acrescentar valor a um produto que habitualmente é usado para alimentação animal.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- selecionar uma formulação de uma bebida tipo *saké* à base de castanhas partidas e pedaços de castanha escolhendo o tipo de substrato, proporção, tipo de *koji* e estirpe de levedura
- otimizar o método de produção da bebida selecionada
- caracterizar a bebida produzida em termos de produtos de fermentação
- avaliar da aceitação por parte dos consumidores da bebida produzida.

3. Material e métodos

3.1 Substratos usados

Na produção tradicional de *saké*, o arroz é o principal substrato. No caso deste trabalho, foi utilizado o arroz mas também a castanha, especificamente, arroz carolino e castanha pilada congelada cujas características se encontram na Tabela 9. A castanha pilada visa simular o subproduto que se obteria de uma indústria de transformação de castanha.

Tabela 9: Valor nutricional dos substratos utilizados (Fonte: Rótulo informativo da composição nutricional dos produtos)

Substrato (/100g)	Marca	Valor energético (kJ)	Proteínas (g)	Hidratos de carbono (g)	Dos quais açúcares (g)	Lípidos (g)	Dos quais saturados (g)	Fibra (g)
Arroz carolino	Saludões	1493	5,7	80	<0,4	0,9	0,4	1,4
Castanha pilada congelada	Saint Eloi	736	2,9	33	5,3	1,6	0	-

3.2 Meios de cultura

Para crescimento dos microrganismos necessários aos ensaios foram preparados dois meios de cultura, YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) e MEA (Malt Extract Agar) para fungos e leveduras, respetivamente.

Os meios foram preparados em água desmineralizada e esterilizados por autoclavagem 121°C, 20 minutos, 1atm, e plaqueados.

3.3 Estirpes usadas

No presente trabalho estiveram envolvidas as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* CBS436 e *Saccharomyces sake* CBS1198 e também o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* CBS 817.72 cultivado e mantido em meio MEA (Anexo I e II).

Todas as estirpes foram adquiridas diretamente à coleção CBS-KNAW Biodiversity Center e mantidas em meio sólido YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar) no caso das estirpes de leveduras e MEA no caso do fungo filamentoso (Anexo I), de acordo com as instruções da coleção.

Os microrganismos necessários para o desenvolvimento do procedimento experimental foram recebidos no laboratório sob a forma de pequenos *vials* de vidro, selados. Para aceder ao conteúdo, foi necessário quebrar o tubo e transferir o conteúdo para tubos microtubo de 2mL contendo água estéril (1,5mL). Este processo foi efetuado em condições de assepsia.

Após a suspensão das culturas, foram então preparadas diversas placas de Petri para cada um dos microrganismos inoculando 100µL da suspensão nas placas contendo cada um dos meios de cultura (MEA e YPD para *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae*, respetivamente).

Após a inoculação, as placas de Petri inoculadas com as estirpes de leveduras foram colocadas em estufa, a 28°C e as caixas inoculadas com a estirpe de *A. oryzae* foram colocadas a temperatura ambiente (20 – 25°C), até se observar crescimento significativo (Figura 11).

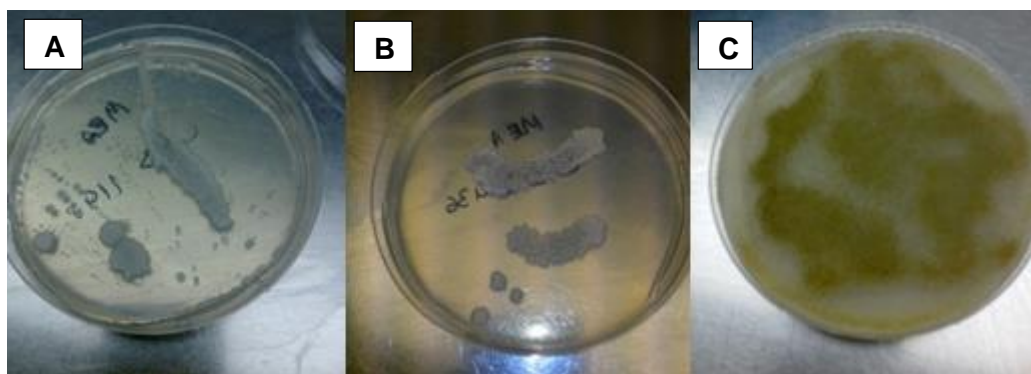


Figura 11: Culturas de *S. cerevisiae* (CBS436 e CBS1198) [A e B] e *A. oryzae* (CBS817.2) [C]

3.3.1 Manutenção das culturas

Visto terem sido preparadas diversas formulações, em momentos diferentes do trabalho, foi necessário refrescar as culturas antes de se iniciar uma nova formulação, ao mesmo tempo que se mantiveram armazenadas culturas isoladas, sem contaminações.

No caso de *Aspergillus oryzae* foi necessário refrescar a cultura para produção de *koji*, sendo que este foi preparado em quantidades razoáveis, possíveis de armazenamento (geralmente cerca de 1kg de arroz e 1kg de castanha). Para tal, utilizando um bisturi, foi cortado um pedaço da cultura preparada anteriormente e colocado num microtubo de 2mL com água estéril. Agitou-se de modo a ressuspender os esporos e plaqueou-se a suspensão

de esporos em água à superfície de uma placa de Petri contendo o meio YPD, com o auxílio de uma vareta de vidro em “L” previamente flamejada.

No caso das estirpes de levedura fez-se um isolamento prévio por riscado em placa de meio YPD para garantir que a cultura estava pura. Após a obtenção de colónias isoladas e iguais, utilizou-se a biomassa de uma das colónias para plaquear por riscado com ansa metálica placas de meio YPD, uma porção da biomassa revestindo a superfície do meio de cultura foi cuidadosamente recolhida com o auxílio de uma ansa metálica, previamente desinfetada com etanol e passada sobre uma chama (até o metal atingir o rubro). A biomassa foi então espalhada na superfície de uma nova placa, gentilmente de forma a evitar danos no frágil gel. Todo o processo foi conduzido em condições de assepsia.

As novas placas preparadas foram incubadas nas condições favoráveis ao seu crescimento (estufa a 28°C para *Saccharomyces cerevisiae*, e temperatura ambiente para *Aspergillus oryzae*).

3.4 Preparação dos substratos

3.4.1 Arroz carolino

O arroz foi usado quer na produção de *koji* quer como substrato de fermentação.

Antes da sua utilização o arroz foi inicialmente lavado, removendo quaisquer impurezas provenientes do seu processo de transformação, utilizando água desmineralizada.

O arroz, foi colocado em água desmineralizada de modo a que o volume de água acima do nível do arroz fosse igual ao volume de arroz e deixado cerca de 24h submerso em água, de forma a absorver alguma água e a facilitar a posterior cozedura a vapor. O copo com o arroz foi coberto com papel de alumínio para proteção de quaisquer impurezas passíveis de se introduzirem no recipiente (Figura 12).

No final do tempo de submersão, escoou-se o arroz procurando retirar o máximo possível de água do copo. O arroz cozido a vapor durante 45 minutos até se apresentar solto (aparelho Bimby VORWERK).

Após cozedura, o arroz foi armazenado em pequenos sacos de plástico e colocado numa arca frigorífica, a -80°C, até utilização posterior. O arroz estava destinado a ser utilizado num curto espaço de tempo, foi armazenado num frigorífico a 6°C.

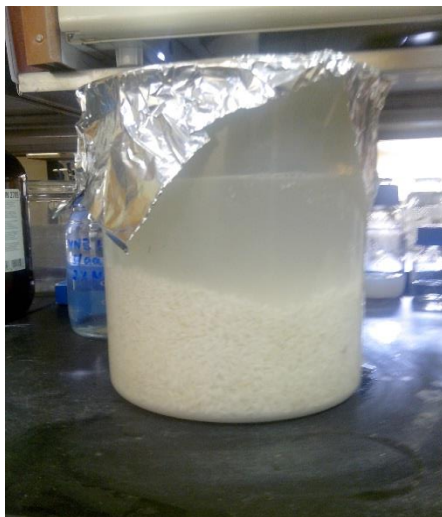


Figura 12: Arroz em imersão

3.4.2 Castanha pilada congelada

A castanha pilada congelada utilizada para produção de *koji* e para fermentação foi utilizada na forma crua ou cozida ao vapor.

No caso da castanha crua, de forma a reduzir o seu tamanho e aumentar a superfície de contacto a castanha foi partida previamente. Apesar de estar congelada, a sua dureza ainda não era suficiente para partir com facilidade, sendo que foi utilizado azoto líquido para a endurecer ainda mais, recorrendo a luvas térmicas para proteger as mãos do operador de quaisquer danos.

A castanha foi partida com o auxílio de um martelo, num grande recipiente de plástico, cortando posteriormente pedaços maiores que restaram com uma faca.

No final, os pedaços de castanha foram ainda colocados num triturador para reduzir ainda mais o seu tamanho. O facto de os pedaços ainda estarem congelados, impediu que o seu tamanho ficasse demasiado reduzido no processo de trituração.

Os pedaços resultantes foram então armazenados em sacos de plástico para posterior utilização e/ou armazenamento em frio.

Em algumas das formulações foi utilizada castanha cozida a vapor. Para tal, após o seu processo de quebra, esta foi cozida 25 minutos a vapor numa bimby VORWERK até apresentar sinais de amolecimento, mas não perdendo totalmente a sua solidez. O produto resultante foi então armazenado em sacos de plástico para posterior utilização e/ou armazenamento congelada.

3.5 Produção de *koji*

A elaboração de *saké* através do método tradicional japonês de preparação desta bebida, implica uma hidrólise do amido em simultâneo com a fermentação alcoólica. Esta hidrólise é efetuada por ação das amilases produzidas por *Aspergillus oryzae* (Tabela 4), que é inoculado na forma de *koji* (ver seção 3.6.3).

Tradicionalmente o *koji* é produzido a partir de arroz. No entanto, e uma vez que se pretendia produzir uma bebida fermentada a partir de subprodutos de castanha, procurou-se numa primeira fase, testar a possibilidade de produzir *koji* a partir de subprodutos da castanha. Paralelamente, produziu-se *koji* de arroz usando como substrato o arroz carolino cozido ao vapor.

O *koji* foi necessário no processo fermentativo para ser usado como *starter* ou *moto*, base fermentativa preparada antes de se dar início à fermentação, e também nas sucessivas adições à mistura principal, para hidrolisar o amido em açúcares mais simples fermentescíveis pelas leveduras.

Para produzir o *koji*, os substratos preparados anteriormente (Pedaços de castanha crua ou cozida a vapor e arroz cozido a vapor) foram inicialmente espalhados numa travessa metálica com orifícios na sua base para permitir que o fungo, após inoculado, respire enquanto se propaga no substrato.

Recolheu-se o conteúdo de uma placa inoculada com *Aspergillus oryzae* raspando com um bisturi de forma a remover toda a biomassa possível e ressuspendeu-se em 50mL de água desmineralizada num tubo *Falcon*. Agitou-se vigorosamente num *vortex* à velocidade máxima de forma a soltar os esporos. Colocou-se o conteúdo do tubo num borrifador e adicionou-se mais 50mL de água. O borrifador foi vigorosamente agitado.

A travessa contendo o substrato foi inoculada com a suspensão borrifando-se com a suspensão a superfície do substrato, de forma a espalhar o fungo por toda a superfície do substrato. Para potenciar a propagação do fungo, o substrato foi cuidadosamente mexido enquanto era inoculado com o auxílio de um garfo metálico (previamente lavado e desinfetado), assegurando que o fungo penetrava nas camadas inferiores do substrato, tornando a inoculação o mais homogênea possível. A parte superior da travessa foi coberta com uma camada de gaze.

Após a inoculação, o substrato foi colocado à temperatura ambiente durante 7 – 10 dias. Durante a propagação do fungo no substrato, diariamente, o conteúdo das travessas foi cuidadosamente mexido com auxílio de um utensílio previamente lavado e desinfetado (geralmente uma colher ou um garfo metálico), impedindo a aglomeração. Diariamente foi também gentilmente removido o excesso de humidade e gotículas provenientes da respiração do fungo utilizando papel absorvente.

O *koji* produzido a partir de arroz foi retirado e armazenado quando se observou um crescimento abundante do fungo.

No caso do *koji* de castanha, com vista a acelerar o processo de produção de esporos foi ainda feita uma segunda produção em estufa a 28°C, utilizando um cesto com aberturas a toda a volta, facilitando a respiração. O fundo foi coberto com gaze, de novo com um espaço entre a base do cesto e a superfície; a parte superior foi também coberta com uma única camada de gaze.

3.6 Fermentação

3.6.1 Preparação do *starter* ou *moto*

Antes de iniciar a fermentação, foi necessário preparar o *starter*, uma mistura de substrato com *koji* que visa proporcionar alguns açúcares mais simples que possam ser fermentados pelas leveduras.

O *starter* foi preparado em balões de Erlenmeyer estéreis com rolha de algodão, com um volume adequado dependendo da quantidade de *saké* que se pretendia preparar. Pesou-se uma porção de *koji* e de substrato, colocou-se no balão de Erlenmeyer e adicionou-se água estéril de acordo com o volume de *starter* pretendido (Tabela 10). Para possibilitar a fermentação simultânea de mais formulações, foram reduzidas as quantidades de ingredientes e volumes (descrito mais à frente) em 10 vezes do valor inicial, (formulação A, B, C, D, E, F, G, H, I, J Tabela 10). Quando foi escolhida a formulação final, esta foi produzida em maiores quantidades para posterior prova sensorial (formulação Fc).

Tabela 10: *Starters* preparados neste trabalho

Formulação	Base do <i>koji</i>	Tipo de substrato no <i>starter</i>	Substrato (g)	<i>Koji</i> (g)	Água (mL)
A436, A1198	Arroz	Arroz	30	15	100
C436, C1198	Arroz	Castanha crua	30	15	100
A, B	Castanha	Castanha crua	30	3,75	100
C, D	Castanha	Castanha crua	3	1,5	100
E, F, G, H	Arroz	Castanha crua	3	1,5	100
I, J	Arroz	Arroz + Castanha crua	3	1,5	100
Fc	Arroz	Castanha	60	30	200

Após a adição do *koji*, substrato e água no recipiente, aqueceu-se a mistura em banho de água (Figura 14), sem agitação, a 50°C e durante cerca de 5h.



Figura 13: Recipiente para banho com água e mangueiras acessórias

A cada meia hora, aproximadamente, foi efetuada uma ligeira agitação manual, para uniformizar a mistura.

Antes de se iniciar a inoculação com leveduras, arrefeceram-se os balões de Erlenmeyer até cerca de 25-28°C.

3.6.2 Preparação do inóculo de levedura

Para inocular o *starter* já preparado e dar início à fermentação, preparou-se o inóculo de leveduras (CBS436 e CBS1198). Para tal, recolheu-se uma porção de biomassa da superfície das placas, com o auxílio de uma ansa metálica.

A biomassa foi usada para inocular balões de Erlenmeyer, de 100mL, contendo meio de cultura YPD líquido, já preparado anteriormente. Os balões contendo a levedura em meio

YPD foram colocados numa estufa a 28°C, com agitação (Figura 15), durante pelo menos 6h.



Figura 14: Estufa de pequenas dimensões

Ao fim das 6h de incubação, mediu-se a absorvância a 640nm da suspensão ou da suspensão diluída a fim de saber se existia um número de células aceitáveis para proceder à inoculação do *starter*. O espectrofotómetro (Ultraspec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer) foi calibrado, utilizando como ensaio em branco uma cuvette contendo 1mL de água desmineralizada (Figura 16).



Figura 15: Espectrofotómetro e *cuvette*

A fim de determinar o número de células aproximado utilizou-se a relação de DO=1 equivalente a 3×10^6 células/mL.

Para determinar o volume de inóculo necessário para conter a quantidade de biomassa pretendida, foi utilizada a seguinte equação:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Sendo: C_1 – Concentração do inóculo

V_1 – Volume do inóculo a retirar

C_2 – Concentração de células desejada

V_2 – Volume final do *starter* + volume após a primeira adição

Uma vez determinado o volume de inóculo necessário para inocular o *starter* com biomassa suficiente, este foi inoculado no balão de Erlenmeyer contendo o *starter*.

3.6.3 Mistura principal

A mistura principal compreendeu uma série de adições sucessivas ao *starter* já preparado e inoculado. A adição de substrato, *koji* e água foi realizada em três adições sucessivas, com um dia de intervalo antes de efetuar a terceira e última adição. As quantidades de ingredientes (formulações A436, A1198, C436 e C1198, Tabela 11) de cada adição são descritas na Tabela 12.

Tabela 11: Lista de formulações

Denominação	Base do <i>koji</i>	Substrato	Estirpe	Tempo de fermentação (Dias)
A436	Arroz	Arroz cozido a vapor	CBS 436	14
A1198	Arroz	Arroz cozido a vapor	CBS 1198	14
C436	Arroz	Castanha crua	CBS 436	14
C1198	Arroz	Castanha crua	CBS 1198	14
A	Castanha	Castanha cozida a vapor	CBS 436	14
B	Castanha	Castanha cozida a vapor	CBS 1198	14
C	Castanha	Castanha cozida a vapor	CBS 436	7
D	Castanha	Castanha cozida a vapor	CBS 1198	7
E	Arroz	Castanha crua	CBS 436	7
F	Arroz	Castanha crua	CBS 1198	7
G	Arroz	Castanha cozida a vapor	CBS 436	7
H	Arroz	Castanha cozida a vapor	CBS 1198	7
I	Arroz	Arroz cozido a vapor + castanha crua	CBS 436	7
J	Arroz	Arroz cozido a vapor + castanha crua	CBS 1198	7
Fc	Arroz	Castanha crua	CBS 436	7

No caso das formulações iniciais, o *koji* utilizado foi o produzido a partir de arroz. No caso das formulações com castanha utilizou-se uma menor proporção de *koji* e uma maior quantidade de água de acordo com o descrito na Tabela 12 e noutras situações houve necessidade de aumentar o volume (Tabela 13).

Tabela 12: Quantidades iniciais de ingredientes para a mistura principal

	Substrato (g)	Koji (g)	Água (mL)
1ª Adição (Dia 0)	60	25	75
2ª Adição (Dia 1)	115	35	175
3ª Adição (Dia 3)	200	50	375

Tabela 13: Quantidades de ingredientes ajustadas para *koji* concentrado e escassez de água

	Substrato (g)	Koji (g)	Água (mL)
1ª Adição (Dia 0)	60	6,25	150
2ª Adição (Dia 1)	115	8,75	350
3ª Adição (Dia 3)	200	12,5	750

Uma vez que havia necessidade de testar muitas hipóteses em simultâneo, reduziu-se o volume, fazendo-se as fermentações em balões de Erlenmeyer de 500mL (Tabela 14 e Tabela 15).

Tabela 14: Quantidades de ingredientes para formulações de volume reduzido

	Substrato (g)	Koji (g)	Água (mL)
1ª Adição (Dia 0)	6	2,5	15
2ª Adição (Dia 1)	11,5	3,5	35
3ª Adição (Dia 3)	20	5	75

Tabela 15: Quantidades de ingredientes para formulações de volume reduzido e substrato misto (castanha crua + arroz cozido a vapor)

	Substrato (g)	Koji (g)	Água (mL)
1ª Adição (Dia 0)	3 + 3	2,5	15
2ª Adição (Dia 1)	5,75 + 5,75	3,5	35
3ª Adição (Dia 3)	10 + 10	5	75

No caso da formulação final, foi produzida uma maior quantidade de bebida, pelo que foi necessário ajustar as quantidades dos ingredientes. Neste caso, foi utilizado *koji* de arroz (ver Tabela 16). As quantidades foram ajustadas para 1,5 vezes a quantidade dos ingredientes iniciais, de forma a não diluir demasiado os microrganismos.

Tabela 16: Quantidades de ingredientes da formulação final

	Substrato (g)	Koji (g)	Água (mL)
1ª Adição (Dia 0)	90	37,5	150
2ª Adição (Dia 1)	172,5	52,5	350
3ª Adição (Dia 3)	300	75	750

Logo após inocular o *starter* com as leveduras, procede-se à primeira adição de ingredientes. Antes de se proceder à adição, foi retirada uma amostra da mistura, utilizando uma micropipeta, sendo a amostra colocada num microtubo. Com o auxílio de colheres metálicas e/ou plásticas e de uma balança, os ingredientes (*koji* e substrato) foram pesados para o interior de um pequeno copo, de vidro ou plástico, devidamente higienizado. O volume de água desmineralizada foi também medido utilizando um copo, de volume variável consoante o pretendido. Os ingredientes foram então adicionados à mistura principal. O frasco contendo a mistura principal foi então colocado numa estufa (Figura 17), à primeira temperatura estipulada (14°C) (Figura 18). Esta adição compreende o dia 0.



Figura 16: Estufa de fermentação

No dia seguinte, dia 1, foi novamente adicionada nova quantidade de ingredientes com o mesmo procedimento e precauções de antes, e a temperatura foi reduzida para 10°C. Após um dia de intervalo, foi efetuada a adição final de ingredientes, com o mesmo procedimento e reduzindo-se a temperatura para 7°C. A última adição compreende o dia 3. Após o dia 3 a temperatura é ajustada para 16°C e permanece dessa forma até ao final da fermentação.

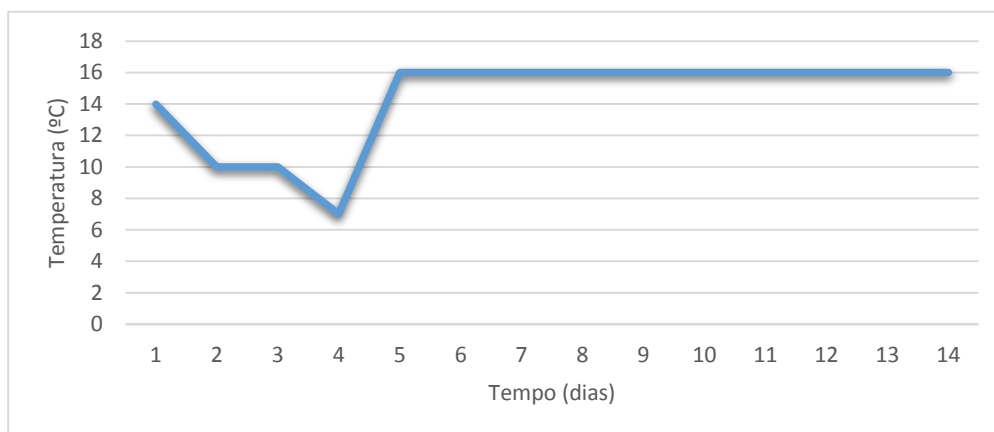


Figura 18: Temperaturas recomendadas de fermentação (Fonte: Adaptado de Yoshizawa *et al.*, 2004)

Diariamente, uma amostra da mistura principal foi retirada e centrifugada (12000 rpm, 2 minutos), sendo o líquido sobrenadante transferido para um novo microtubo. As amostras foram armazenadas em suportes e no frio, para posterior análise.

No final do tempo de fermentação os frascos contendo a mistura principal foram retirados. Para remover os resíduos sólidos maiores, foi efetuada uma filtração simples colocando um filtro de vidro, coberto de finas camadas de gaze, no topo de um frasco. A mistura foi então vertida sobre o filtro.

Após a primeira filtração, foi efetuada uma centrifugação do líquido, a 12000 rpm durante 5 minutos. O líquido resultante, agora cristalino, foi transferido para novos frascos Erlenmeyer ou frascos SCHOTT, dependendo do volume. Os frascos SCHOTT revelaram uma maior facilidade de operar no processo de pasteurização que se seguiu.

Os frascos ou copos contendo o líquido foram pasteurizados no banho de água já utilizado anteriormente, mas desta vez durante 30 minutos e a 65°C (Figura 19). Após a pasteurização, o líquido foi armazenado no frio para posterior prova.



Figura 19: Formulações em processo de pasteurização

3.7 Tratamento e análise das amostras

3.7.1 Amostragem

Ao longo dos vários passos do processo foram recolhidas amostras do sobrenadante para posterior análise da concentração de glucose e outros componentes.

Durante a preparação do *starter* foi também tirada uma amostra da mistura de hora a hora, no volume de aproximadamente 2mL para *eppendorfs* de 2mL. As amostras retiradas foram centrifugadas para remover quaisquer resíduos sólidos e o líquido foi transferido para outro microtubo, sendo armazenado em suportes no frio (6°C).

Antes de se proceder à adição da levedura, foi retirada uma amostra da mistura (tempo 0), utilizando uma micropipeta, sendo a amostra colocada num microtubo e refrigerada. Posteriormente, retirou-se diariamente uma amostra da mistura principal, e centrifugou-se (12000 rpm, 2 minutos), sendo o líquido sobrenadante transferido para um novo microtubo. As amostras foram armazenadas em suportes e no frio, para posterior análise.

3.7.2 Curvas de calibração

As amostras recolhidas (do aquecimento do *starter* e de toda a fermentação) foram então analisadas utilizando um aparelho de cromatografia líquida, HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).

Previamente a esta análise foram preparadas soluções padrão de vários compostos para a elaboração de curvas de calibração, atendendo ao que se esperava que ocorresse durante a fase de hidrólise inicial do amido e durante a fermentação para posteriormente ser possível determinar as concentrações destes compostos.

Prepararam-se soluções padrão de glucose entre 0,025%(p/v) e 6%(p/v), de maltose entre 0,05%(p/v) e 5%(p/v), maltotriose entre 0,05%(p/v) e 2%(p/v) e etanol entre 1%(v/v) e 10%(v/v) (Anexo III).

Para facilitar a operação, dado o elevado número de preparações, para cada reagente foi preparada uma solução-mãe, da maior concentração estipulada, e as restantes foram preparadas retirando uma porção para outro balão volumétrico e preenchendo com água. O volume necessário a retirar de cada solução-mãe foi determinado com recurso à equação já utilizada (ver equação das concentrações e volumes).

3.7.3 Tratamento das amostras e soluções para HPLC

As amostras recolhidas (do aquecimento do *starter* e de toda a fermentação) e as soluções para as curvas de calibração foram tratadas e usadas para determinar os metabolitos consumidos/produzidos utilizando um aparelho de HPLC. Um volume de 1mL de cada uma das amostras preparadas foi colocado em microtubos. Em cada um dos microtubos foi adicionado 30 μ L de ácido perclórico (10%(v/v)). Após a adição do ácido perclórico, os tubos foram colocados em gelo durante 30 minutos, após o que foram centrifugados, a 12000 rpm e durante 10 minutos, e o sobrenadante foi recolhido. Posteriormente, filtraram-se as amostras e soluções com o dispositivo (Figura 20), usando uma membrana de nitrocelulose de 0,22 μ m de poro. O conteúdo foi filtrado para o interior de *vials* (Figura 20), que posteriormente foram introduzidos no amostrador automático do HPLC.



Figura 20: Seringa associada a filtro (esquerda) e vial (direita)

Todas as amostras de todas as formulações sofreram exatamente o mesmo tratamento, com o mesmo procedimento e foram introduzidas no HPLC a fim de analisar as concentrações dos compostos estipulados (glucose, maltose, maltotriose e etanol).

3.7.4 Preparação do eluente

Antes de utilizar o aparelho de HPLC foi necessário preparar o eluente. Para tal, foi preparada uma solução de ácido sulfúrico (98% de pureza) a uma concentração de 5mM. Para lavagem da coluna foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico a 25mM

A solução foi desgaseificada antes de poder ser utilizada, usando-se para o efeito um banho de ultrassons e um sistema de vácuo, aplicado durante 45 minutos. Efetuaram-se novas desgaseificações sempre que as soluções preparadas permaneceram armazenadas demasiado tempo e/ou fossem agitadas.

3.7.5 HPLC

Os *vials* das amostras foram colocados no sistema de HPLC, com um controlador (CROCO-CIL, Temperature Control), um sistema de bomba de injeção (Waters, 515 HPLC Pump) , associado a uma coluna de exclusão iónica para análise de açúcares e ácidos orgânico (SUGAR SH1011, Shodex), um sistema de amostragem automática (Waters, 717 plus Autosampler) e a um sistema de deteção de absorvância na gama dos UV (Abs a 210nm) (Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector) e um detetor de índice de refração (Waters 2410 Refractive Index Detector). Para cada amostra foram efetuadas 3 injeções. O processo foi conduzido com a coluna a 60°C com um fluxo de 0,5mL/min de ácido sulfúrico 5mM, sendo introduzidos no sistema 10 µL de amostra em cada injeção. Os dados foram retirados e tratados, de forma a obter as curvas de calibração e a concentração de cada composto nas amostras.

As amostras foram então inseridas no aparelho de HPLC. Foi ordenado remotamente através de um computador que o processo decorresse em injeções de 30 minutos, com o objetivo de detetar todos os compostos estipulados. As injeções foram ainda efetuadas em triplicado.



Figura 17: Sistema de HPLC

3.8 Provas sensoriais

Uma vez escolhida a formulação mais adequada e de melhores características organoléticas. A formulação foi então colocada à disposição de um número de pessoas para prova (estipulou-se inicialmente um número mínimo de 30 provadores). Os provadores eram não treinados (consumidores). Foram servidas duas amostras, da formulação final Fc (ver Tabela 15), sendo a A uma amostra normal de Fc e B uma amostra diluída de Fc diluída com água.

As provas sensoriais foram conduzidas numa sala de prova, previamente reservada, tendo as amostras sido servidas em copos de plástico descartáveis, devidamente identificados sendo disponibilizado um copo extra aos provadores para colocar água.

4 Resultados e discussão

4.1 Condições de produção de koji

Em relação ao *koji* de arroz este foi produzido inoculando arroz carolino previamente cozido a vapor e drenado num tabuleiro de metal perfurado. O arroz foi inoculado à superfície, remexendo-se de forma a que o inóculo fosse distribuído homogeneamente, foi coberto com uma camada quadrupla de gaze, e colocado à temperatura ambiente até se observar um crescimento significativo do fungo (Figura 18A). Periodicamente (manhã e tarde), remexeu-se a massa de arroz e esporos, a fim de reduzir a temperatura no interior da massa de arroz e promover uma maior distribuição do fungo eliminando os agregados que se foram formando.



Figura 18: Produção de *koji* de arroz (A) e *koji* de castanha (B)

Ao longo do período de incubação foi possível observar o desenvolvimento do fungo, inicialmente apenas com micélio branco que originava agregados de arroz e posteriormente observando-se esporulação com o aparecimento de um “pó” de tom mais esverdeado. O aparecimento dos esporos determinou o fim da incubação, congelando-se a -80°C o *koji* produzido.

Para produzir *koji* a partir de castanha, numa primeira abordagem inoculou-se castanha crua com uma suspensão de esporos e hifas de *A. oryzae* tal como se efetuou no caso do *koji* de arroz. No entanto, ao fim de dois dias foi detetado um cheiro ácido e sinais visíveis de degradação. Este facto foi atribuído a uma temperatura ambiente não controlada no interior do laboratório terá provocado uma fermentação rápida da fração de açúcares simples naturalmente ocorrentes na castanha, por parte de quaisquer microrganismos nela contidos que não *A. oryzae* visto que este processo não foi conduzido em condições de esterilidade.

Tendo em conta estes resultados, foi realizado um segundo ensaio, colocando desta vez o recipiente numa estufa a cerca de $25 - 28^{\circ}\text{C}$. O recipiente foi também mudado, em vez do tabuleiro metálico perfurado foi utilizado um cesto de verga com aberturas a toda a volta, facilitando a respiração, a libertação de humidade resultante do processo de respiração do

fungo e evitando o aumento excessivo da temperatura no interior do substrato. O fundo foi coberto com gaze, de novo com um espaço entre a base do cesto e a superfície; a parte superior foi também coberta com uma camada de gaze. Periodicamente remexeu-se a castanha inoculada e removeu-se a humidade acumulada na estufa de incubação.

Nas novas condições, a propagação do fungo na superfície e interior do substrato foi rápida e intensa, adquirindo uma coloração verde escura indicativa de uma enorme quantidade de esporos (Figura 22B) ao fim de 4 dias. O *koji* foi armazenado a -80°C.

4.2 Formulações preliminares

Com vista a obter uma formulação sensorialmente apelativa efetuaram-se vários ensaios em que se foram variando parâmetros como o tipo de *koji*, o tipo de substrato e a estirpe de levedura. Para além foram sendo igualmente introduzidas modificações no processo de fermentação em termos de tempo de fermentação. Estas alterações foram introduzidas em função dos dados sensoriais e analíticos (HPLC) que foram registados para cada formulação.

4.2.1 Avaliação do efeito da estirpe de levedura em saké de castanha produzido a partir de castanha crua e *koji* de arroz (A436, A1198, C436, C1198)

Para produção de saké a partir de castanha foram efetuados inicialmente dois ensaios com castanha e *koji* de arroz usando as duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* adquiridas (ambas isolada de saké), tendo como controlo positivo o processo de produção de saké de arroz. Estes ensaios tiveram essencialmente dois objetivos por um lado avaliar da possibilidade de produzir uma bebida tipo saké a partir de castanha e por outro avaliar qual o efeito da estirpe de *S. cerevisiae* na bebida fermentada.

O *koji* foi inicialmente misturado com a quantidade de água e substrato pretendidos no início da fermentação e incubado durante 5h a 55°C a fim de estimular a produção de amilases por *A. oryzae* e de efetuar uma hidrólise parcial e inicial do amido do substrato de forma a já existirem açúcares disponíveis para a fermentação pelas estirpes de *S. cerevisiae* a quando do inóculo da levedura.

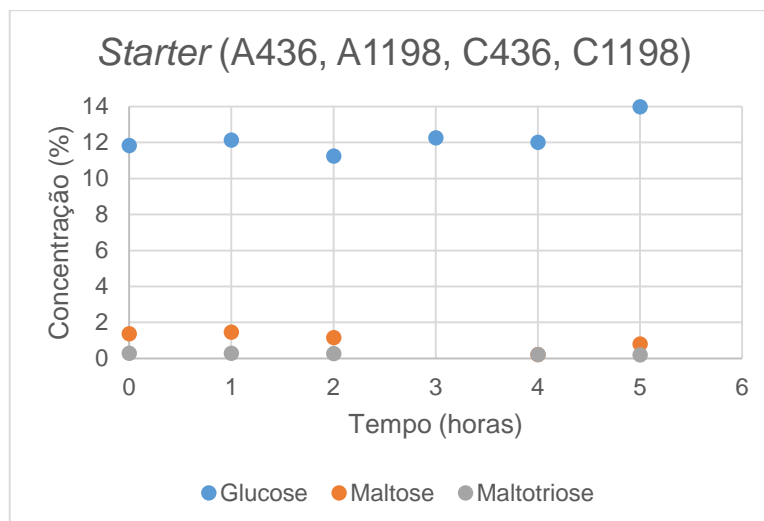


Figura 19: Variação das concentrações de açúcares e etanol no *starter* (A436, A1198, C436 e C1198)

A figura 19 apresenta os dados relativos às concentrações dos compostos analisados durante as 5h de incubação do *starter* relativo às primeiras quatro formulações. Observa-se um valor crescente de glucose, em percentagem elevada logo deste o início, muito provavelmente resultado de uma hidrólise parcial do amido durante a cozedura. O aumento progressivo da concentração de glucose deve-se à hidrólise do amido pela ação do *koji*, rico em enzimas produzidas por *Aspergillus oryzae*.

As concentrações de maltose e maltotriose apresentam-se muito reduzidas ao longo de todo o tempo de incubação, o que é explicado pela sua constante quebra em elementos de glucose mais simples, o que também justifica as elevadas concentrações de glucose.

Após a hidrólise inicial, arrefeceu-se a mistura de koji, substrato e água e adicionou-se a suspensão de leveduras procedendo-se ao longo do tempo de acordo com o descrito em 3.6.3 e obtendo-se duas formulações com castanha (C436 e C1198) e duas formulações controlo com arroz (A436 e A1198).

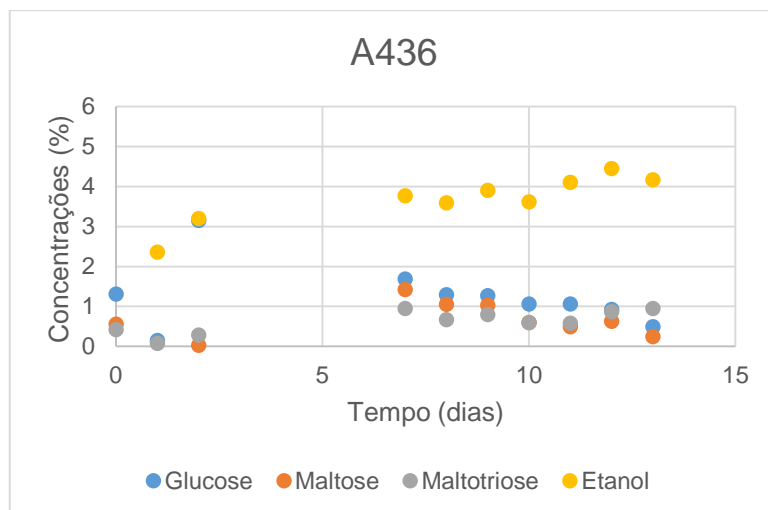


Figura 20: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação A436

Na formulação A436 (Figura 20), as concentrações de glucose, maltose e maltotriose variaram nos primeiros devido às sucessivas diluições do meio consequência das adições de ingredientes (*koji*, substrato e água), registando a partir do segundo dia uma subida até ao sétimo dia, resultado da hidrólise do amido, observando um decréscimo até ao final da fermentação. Os valores de maltotriose são aproximadamente constantes a partir do sétimo dia podendo ser resultado do facto de o substrato não ser consumido na totalidade. Por outro lado a glucose e maltose são consumidas a partir do sétimo dia atingindo valores inferiores a 0,5% no final da fermentação.

A concentração de etanol aumenta de forma esperada ao longo de todo o tempo de fermentação, como resultado da fermentação alcoólica a partir dos açúcares consumidos.

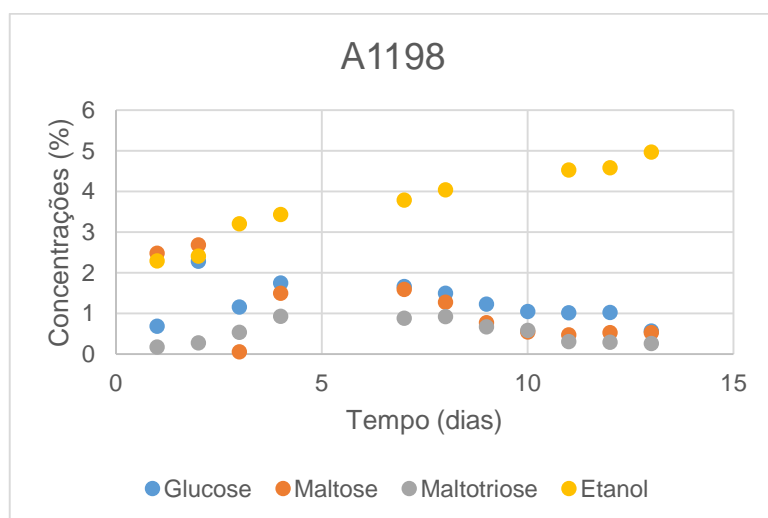


Figura 21: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação A1198

A formulação A1198 (Figura 21) apresenta um perfil muito semelhante ao da A436, com as concentrações de glucose, maltose e maltotriose a decrescer ao longo do tempo, acompanhadas de um aumento da concentração de etanol. Regista-se alguma variabilidade nestas concentrações nos dias iniciais resultante das sucessivas diluições do meio consequência das adições de ingredientes, atingindo o pico das concentrações no dia 4, a partir do qual se inicia um comportamento descendente.

A concentração do etanol aumenta de forma esperada ao longo do tempo de fermentação, como resultado da fermentação alcoólica.

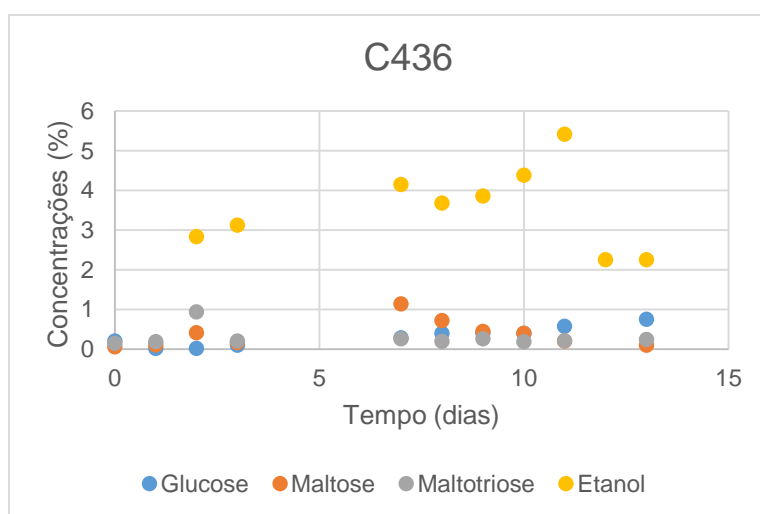


Figura 22: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação C436

A formulação C436 (Figura 22) revelou concentrações iniciais de glucose, maltose e maltotriose reduzidas, com bastante variabilidade nos dias iniciais provocada pelas sucessivas adições de ingredientes à semelhança do que já havia sido observado nos outros dois casos. Observou-se um aumento progressivo da concentração de etanol, para um valor semelhante às formulações analisadas anteriormente, resultante do consumo dos açúcares, cuja concentração permaneceu baixa ao longo da fermentação. Contudo, registou-se uma quebra da concentração de etanol nos dias finais da fermentação. Esta quebra é indicativa de uma possível metabolização secundária indesejada que poderá ser por exemplo uma fermentação acética.

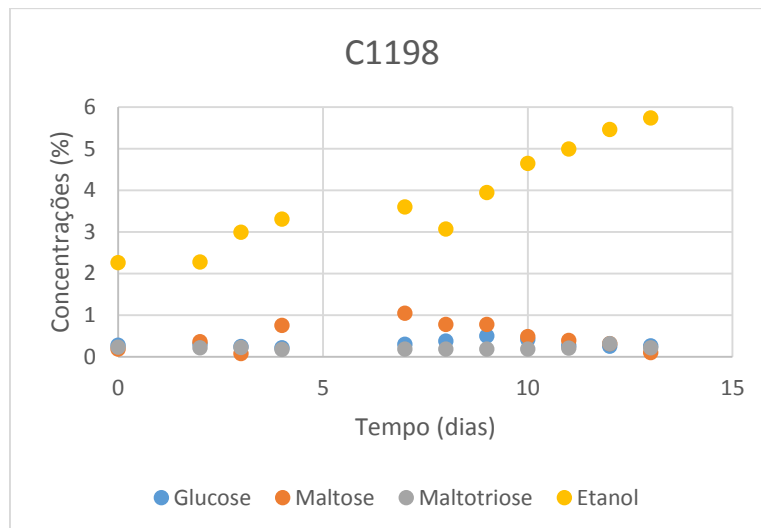


Figura 23: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação C1198

Na formulação C1198 (Figura 23) os valores de glucose e maltotriose não registaram variações significativas ao longo do tempo, permanecendo em valores baixos durante toda a fermentação, com um pico ao dia 7, decrescendo até valores muito próximos de 0, o que é consistente com o crescente valor de etanol ao longo do tempo, até ao final da fermentação.

Após a conclusão de cada uma das formulações, estas foram provadas em laboratório, proporcionando uma breve análise das suas características. Relativamente às formulações iniciais (A436, A1198, C436, C1198), estas apresentavam-se, em geral com um sabor amargo e ligeiramente ácido (mais ácido nas formulações com castanha), com as formulações com a estirpe CBS 436 a revelarem um perfil consideravelmente mais aromático. O conteúdo alcoólico foi evidente nestas formulações, algo esperado tendo em conta o que é considerado normal para *saké*, especialmente nas que continham apenas arroz. O sabor ácido registado coincide com os dados obtidos numa das formulações (C436) em que foi registada uma quebra na concentração de etanol, denunciando uma fermentação secundária, provavelmente acética.

O sabor a etanol foi consideravelmente mais evidente nas formulações produzidas a partir de arroz, contudo os dados revelam que as formulações contendo castanha tenderam a possuir uma concentração superior de etanol. O fato de não se sentir tão significativamente o etanol poderá resultar de haver uma sobreposição de sensações, entre o alcoólico e o amargo que se sentiu nas formulações com castanha crua.

4.2.2 Avaliação do efeito da estirpe de levedura em *saké* de castanha produzido a partir de castanha crua e *koji* de castanha (A, B)

Uma vez que se pretendia tentar produzir uma bebida que fosse inteiramente à base de castanha, os ensaios seguintes foram realizados da mesma forma que os anteriores (4.2.1) substituindo o *koji* de arroz por *koji* de castanha. Para além disso, nas primeiras formulações C436 e C1198, verificou-se que a castanha hidratava muito ao longo da fermentação, aumentando de volume e reduzindo a quantidade de líquido obtida (Figura 24). Assim sendo nas formulações seguintes o volume de água foi duplicado (ver Tabela 13).



Figura 24: Formulações já preparadas (esquerda - arroz, direita - castanha)

Visto que o *koji* produzido a partir de castanha produziu uma enorme quantidade de biomassa e esporos superior à do *koji* de arroz, a quantidade de *koji* utilizado foi modificada tendo em conta a base utilizada (arroz ou castanha), sendo por isso uma porção mais reduzida no caso da castanha (ver Tabelas 13 e 14). A quantidade de *koji* de castanha utilizado foi reduzido em quatro vezes, para as formulações A e B mantendo-se a quantidade de substrato que foi adicionada nos primeiros dias da fermentação.

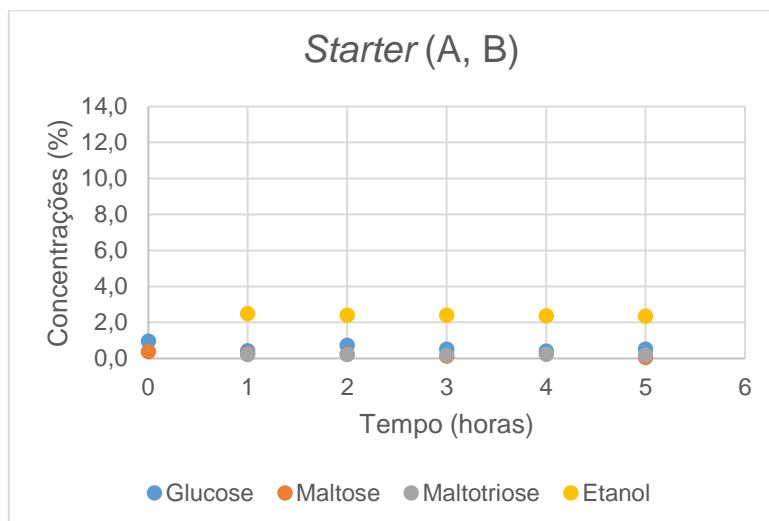


Figura 25: Variação das concentrações de açúcares e etanol no *starter* (A e B)

No caso do *starter* (Figura 25), após uma aumento inicial as concentrações de glucose, maltose e maltotriose mantiveram-se baixas, e em simultâneo observou-se algum etanol ao contrário do esperado e observado no primeiro *starter* usado, o que pode indicar que existiu alguma fermentação durante as horas de incubação do *starter* quer por *A. oryzae* quer por outros microrganismos indesejados, uma vez que o processo não é realizado em condições de assepsia.

As formulações A e B que usaram o mesmo starter (Figura 26 e Figura 27) seguiram a tendência já verificada no *starter*, mantendo a concentração de etanol já existente ao longo do tempo, com poucas variações, ao contrário do que seria de esperar para uma fermentação alcoólica, o que indica que a fermentação não ocorreu ou foi muito lenta, ou que existiram processos secundários em simultâneo que consumiram o etanol. Esta hipótese parece provável uma vez que as concentrações de glucose, maltose e maltotriose foram reduzidas, decrescendo ao longo do tempo até valores próximos de 0, indiciando o consumo de açúcares sem respetivo aumento visível do etanol.

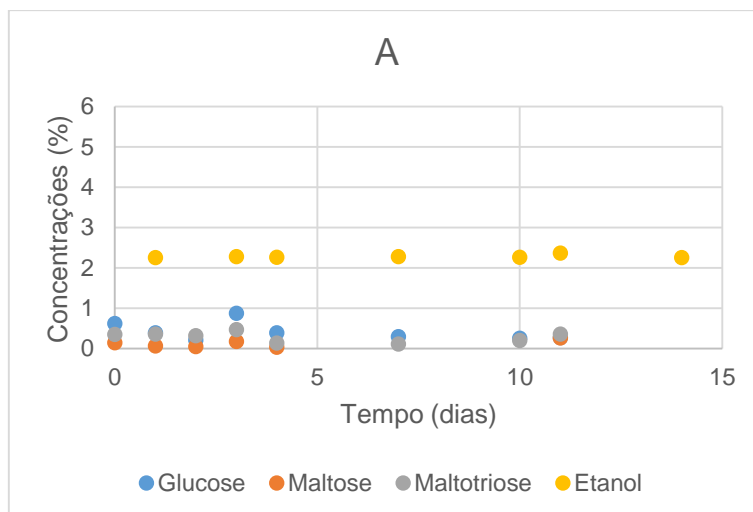


Figura 26: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação A

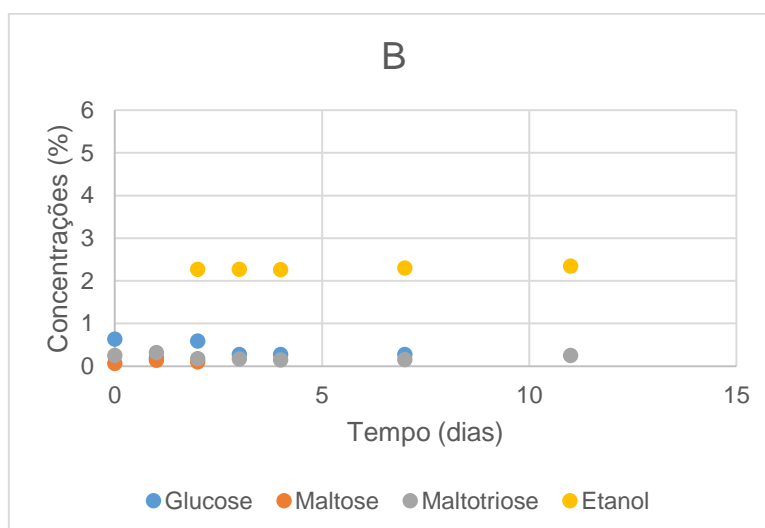


Figura 27: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação B

Ambas as amostras A e B se revelaram sensorialmente ácidas, muito mais que as formulações iniciais, sem traço de etanol no seu sabor, facto suportado pelas baixas concentrações registadas por HPLC.

4.2.3 Avaliação do efeito da estirpe de levedura em *saké* de castanha produzido a partir de castanha cozida e *koji* de castanha (C,D)

A maior acidez observada nas formulações iniciais de castanha (C436, C1198, A e B), foi inicialmente atribuída a compostos fenólicos contidos na castanha crua, pelo que se decidiu

usar castanha cozida a vapor nas formulações seguintes (C, D) de modo a reduzir o teor de compostos fenólicos do substrato usado. Para além disso, uma vez que o painel que provou as bebidas considerou existir um travo a ácido e visto que os inóculos não foram realizados em condições de assepsia, colocou-se a hipótese de estar a ocorrer um segundo processo que envolveria a conversão do etanol em ácido acético, por exemplo. No sentido de resolver esta questão, reduziu-se o tempo de fermentação para metade de modo a evitar fermentações secundárias.

Para o *starter* que deu origem às formulações C e D apenas se obtiveram leituras da hora 0, revelando neste tempo uma concentração de glucose inicial considerável, possivelmente resultado da fração de açúcares simples naturalmente ocorrentes na castanha. Há ainda a ocorrência de alguma maltotriose, resultante da hidrólise do amido por *A. oryzae* não se verifica a presença de etanol ou maltose.

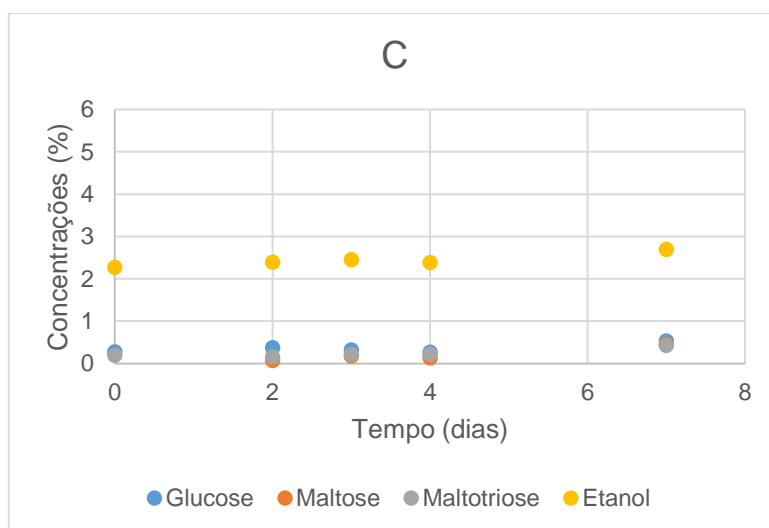


Figura 28: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação C

A formulação C (Figura 28) tem um perfil de açúcares e etanol similar ao observado em A e B, apresentando valores de glucose, maltose e maltotriose reduzidos, com uma redução progressiva e esperada ao longo do tempo até atingir valores muito próximos de 0. O etanol registou valores muito constantes ao longo do tempo, revelando um comportamento ligeiramente crescente.

No caso da formulação D apenas foi possível obter leituras no dia 3, pelo que se optou por não o considerar. No entanto, para o valor registado, e à semelhança da formulação C, a

formulação D apresentou valores de todos os compostos muito reduzidos, com a ocorrência de etanol.

Apesar de não terem sido obtidos muitos dados relativos a D, esta apresentou-se idêntica sensorialmente a C, persistentemente ácida, e sem se sentir o grau alcoólico, o que é demonstrado pelas baixas concentrações de etanol registadas.

4.2.4 Comparação entre o *saké* de castanha produzido a partir de castanha cozida, castanha crua e substrato misto usando *koji* de arroz (E, F, G, H, I, J)

Uma vez que todas as formulações anteriores que usavam *koji* de castanha apresentaram um elevado grau de acidez mesmo depois de se ter reduzido o tempo de fermentação, optou-se por realizar novos ensaios usando apenas *koji* de arroz e avaliando o efeito do substrato e da levedura. Neste sentido, mantendo o mesmo *starter* (a partir de *koji* de arroz e substrato castanha crua) para as formulações E, F, G e H, usou-se como substrato castanha crua (E e F) e castanha cozida (G e H).

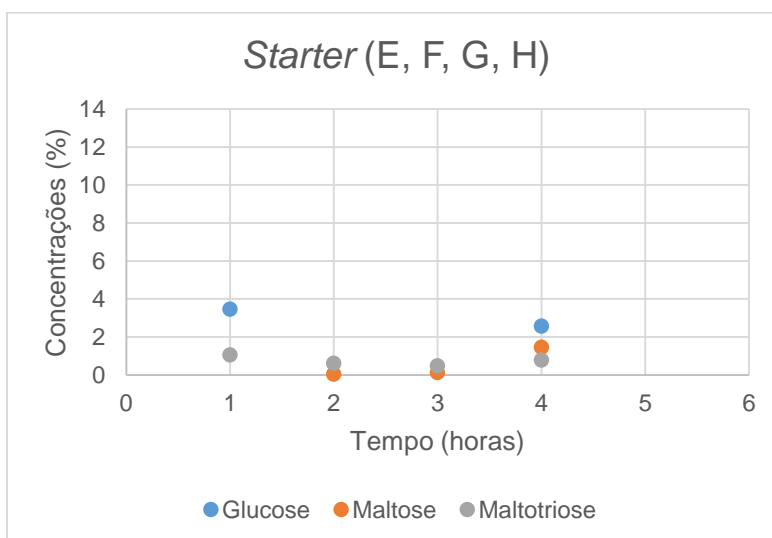


Figura 29: Variação das concentrações de açúcares e etanol no *starter* (E, F, G, H)

A figura 29 apresenta as concentrações presentes no *starter* que deu origem às formulações E, F, G e H. Apesar de o número de pontos recolhidos ser menor é possível verificar a ausência de produção de etanol e a ocorrência de uma hidrólise parcial do amido por acção das amílases do fungo.

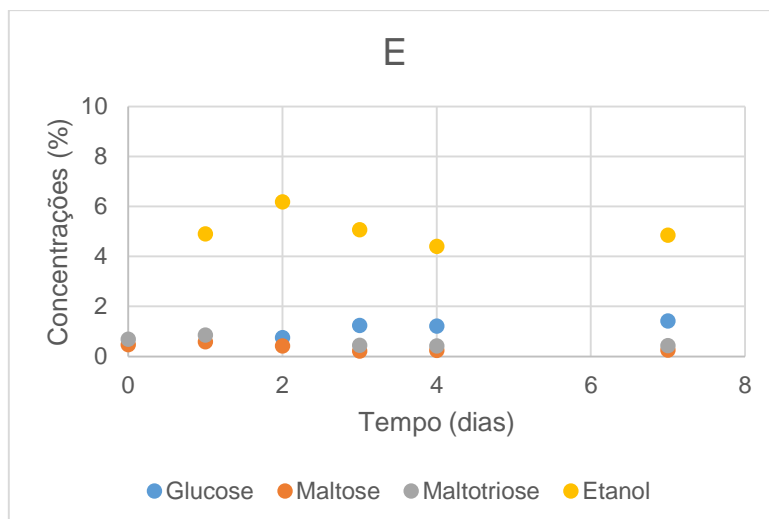


Figura 30: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação E

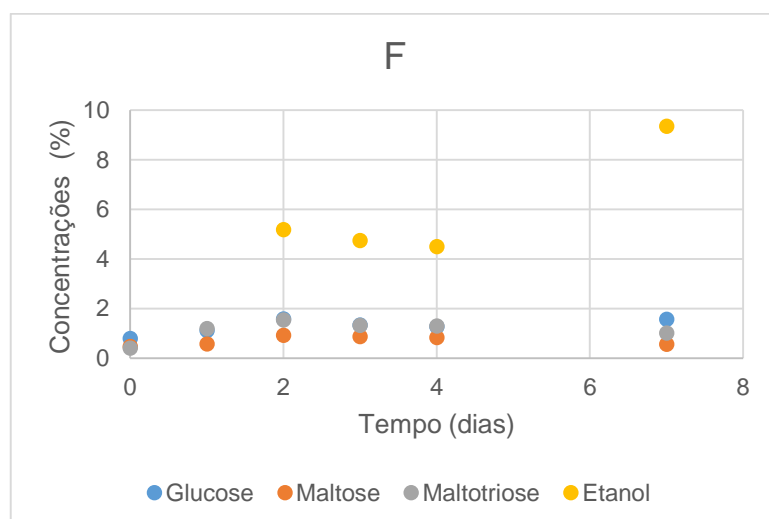


Figura 31: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação F

As concentrações de glucose, maltose e maltotriose nas formulações E e F (Figura 30 e Figura 31) apresentaram um ligeiro aumento até ao segundo dia.

A concentração de etanol aumentou para ambas as fermentações, registando-se o maior valor ao fim do segundo dia, a partir daí observou-se uma redução da concentração deste composto até ao quarto dia. Esta quebra na concentração de etanol poderá atribuir-se a uma fermentação secundária, como por exemplo, acética. Este decréscimo no fim dos 7 dias de fermentação não se observou, no entanto, quando a estirpe de levedura foi *S. cerevisiae* CBS1198, registando-se os valores mais elevados em qualquer formulação, até aqui.

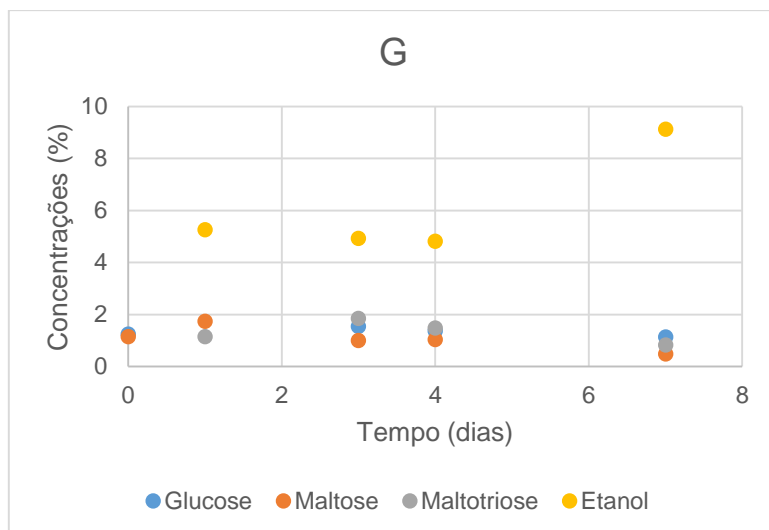


Figura 32: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação G

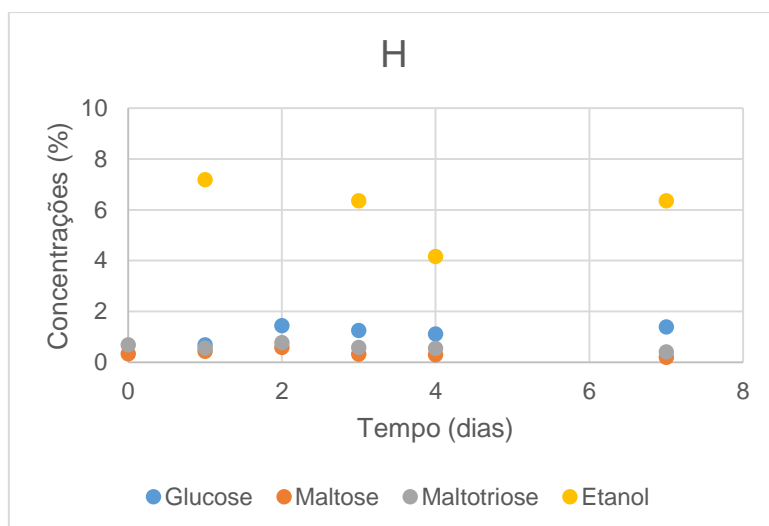


Figura 33: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação H

Nas formulações G e H (Figura 32 e Figura 33) os valores obtidos para os três açúcares sofreram poucas variações nas concentrações, mantendo-se persistentemente baixas e constantes ao longo do tempo, com um decréscimo após segundo/terceiro dia de fermentação. A concentração de etanol em ambas as fermentações registou valores muito similares à formulação F (usando castanha crua como substrato), até ao final do tempo de fermentação. No caso da formulação H, registou-se uma redução inesperada da concentração de etanol ao dia 4, seguida de um novo aumento para o valor anterior.

Estas formulações utilizando *koji* de arroz apresentaram-se consideravelmente mais apelativas sensorialmente, com as que utilizaram castanha crua a registar um sabor

consideravelmente melhor, facto suportado pelas elevadas concentrações de etanol registadas, as maiores até aqui. Contudo, todas estas formulações apresentaram ainda uma acidez bastante elevada.

Para além das formulações em que se usou como substrato a castanha (crua ou cozida) e uma vez que o saké de arroz obtido anteriormente pelo processo usado apresentou um perfil sensorial aceitável, realizaram-se novos ensaios em que se substituiu uma parte do substrato de castanha por arroz. Nesta formulação mista manteve-se castanha crua visto ter sido este substrato que deu resultados sensorialmente mais aceitáveis.

Para a realização destes ensaios usou-se como *starter* o *koji* de arroz juntamente com o mesmo substrato misto que foi depois fermentado.

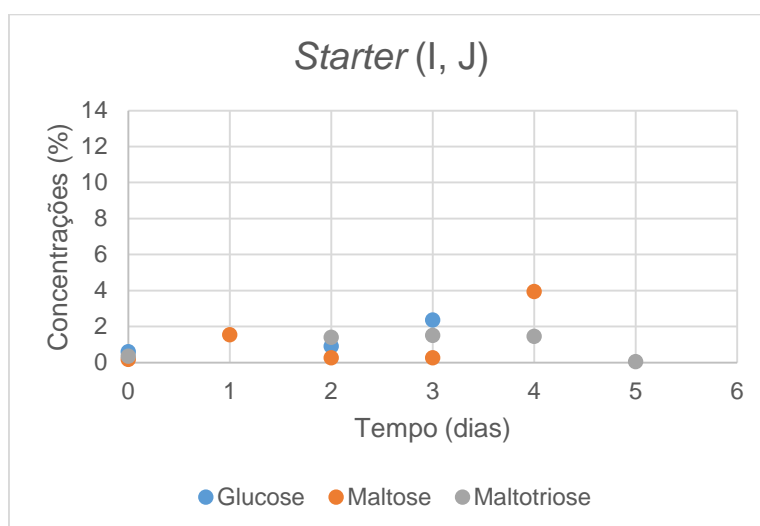


Figura 34: Variação das concentrações de açúcares e etanol no *starter* (I, J)

O *starter* que deu origem às formulações I e J (Figura 34) registou ligeiros aumentos ao longo do tempo em todos os compostos. A glucose apresentou um dos valores mais elevados de todos os *starters* até aqui analisados, com um comportamento crescente ao longo do tempo de incubação. O valor obtido para a concentração de maltotriose, ao fim de cinco horas é discrepante em relação não só aos restantes resultados obtidos para este açúcar mas também em relação aos valores iniciais registados durante a fermentação onde se observam concentrações próximas de 2%. Não se registou a ocorrência de etanol.

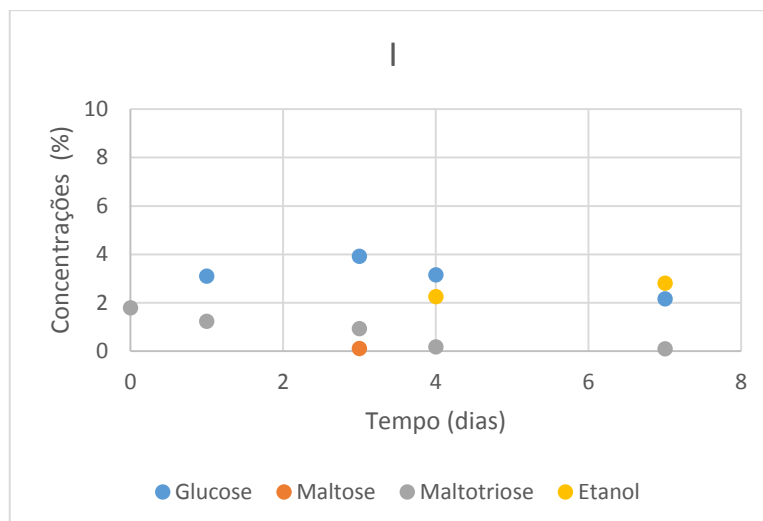


Figura 35: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação I

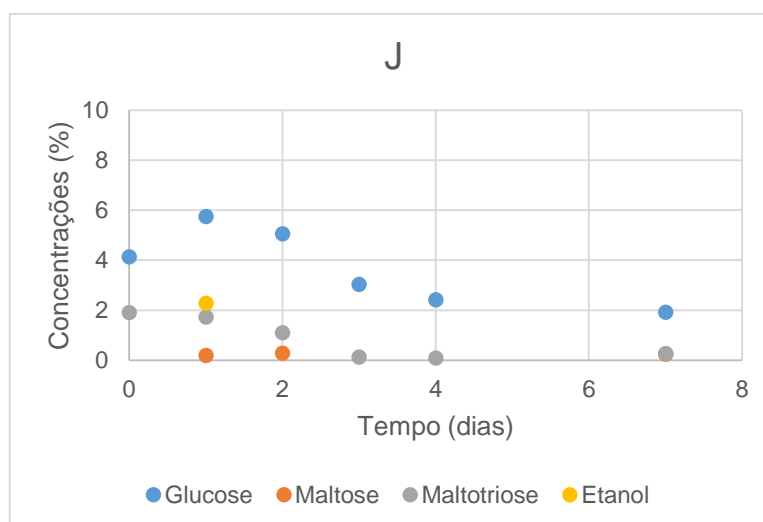


Figura 36: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação J

As formulações I e J (Figura 35) registaram um decréscimo da concentração de glucose ao longo do tempo, após um aumento inicial ao terceiro dia (I) e segundo (J), à semelhança do que já havia sido observado noutros ensaios. A glucose inicial registou um valor mais elevado comparada com os restantes açúcares, diminuindo após o segundo/terceiro dia. Por outro lado, foi possível observar um consumo consistente de maltotriose em ambas as formulações, cuja concentração diminuiu para valores próximos de zero a partir do quarto dia. Acompanhando a redução da concentração dos restantes compostos, o etanol aumentou lentamente ao longo do tempo.

Estas formulações, I e J, estavam muito próximas sensorialmente às formulações E, F, G e H, bastante ácidas, contudo muito menos do que as formulações produzidas utilizando *koji* de castanha e castanha cozida.

4.2.5 Formulação final

As restantes formulações (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) apresentaram uma acidez extremamente elevada e obviamente indesejável, sendo qualquer uma delas inaptas para avançar e ser produzida em mais quantidade para prova sensorial.

As formulações produzidas a partir de castanha cozida a vapor (A, B, C, D, G, H) demonstraram uma acidez muito superior às formulações iniciais, pelo que foi abandonada a utilização de castanha cozida a vapor. Esta elevada acidez foi atribuída a vários fatores, como tempo de fermentação elevado (conduzindo a fermentações secundárias), fermentação dos açúcares simples contidos na castanha por parte de microrganismos indesejados presentes na mistura e a utilização de *koji* produzido a partir de castanha. O *koji* produzido a partir de castanha apresentou uma elevadíssima concentração de esporos, como já referido, o que conduz a uma hidrólise muito rápida do amido, disponibilizando uma grande quantidade de açúcares simples ainda antes da inoculação com as estirpes de levedura desejadas, o que possibilita o crescimento de outros microrganismos. O substrato é assim consumido muito rapidamente, restando uma quantidade muito reduzida para as leveduras, conduzindo a uma fermentação inadequada, produzindo uma bebida ácida e de indesejada.

Foram então reduzidos os tempos de fermentação e abandonada a utilização de *koji* de castanha, porém a elevada acidez manteve-se. Atendendo a isto, elaborou-se uma formulação Fc que reunisse todas as características mais desejadas de outras formulações testadas anteriormente, sendo produzida com *koji* de arroz, castanha crua, a estirpe CBS 436 e um tempo de fermentação reduzido, tendo-se escolhido esta para conduzir provas sensoriais ao público.

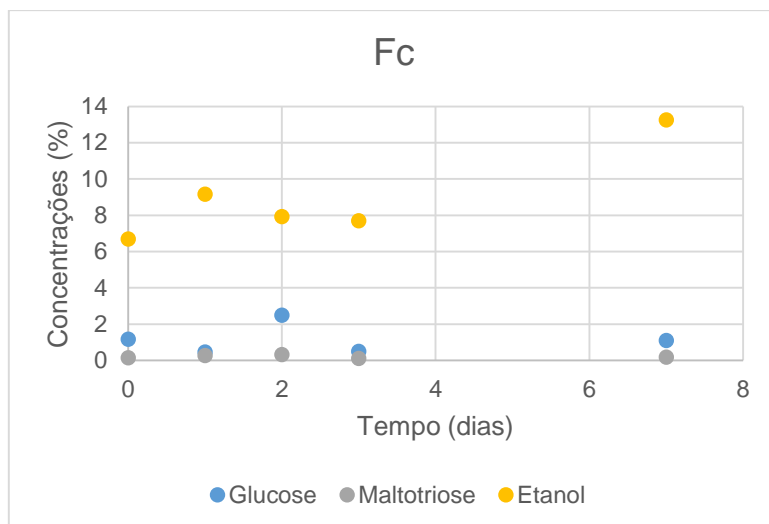


Figura 37: Variação das concentrações de açúcares e etanol na formulação Fc

Na formulação Fc (Figura 37), ocorreu igualmente um aumento da concentração de glucose até ao segundo dia, reduzindo-se a partir daí. A hidrólise do amido explica o aumento das concentrações até ao segundo dia.

A concentração de maltotriose permaneceu baixa durante todo o tempo de fermentação, com poucas variações. Os valores de maltose registados foram muito próximos de 0, podendo estes valores resultar de problemas ao nível da deteção do pico da maltose nos cromatogramas, não sendo possível trata-los com a reta de calibração.

O etanol apresentou concentrações elevadas logo ao fim do primeiro dia, continuando a aumentar, conservando este comportamento até ao final do tempo de fermentação. A concentração de etanol da formulação Fc foi a mais elevada de todas as formulações (13,25%).

Sensorialmente, o resultado foi uma bebida ainda ácida, mas consideravelmente menos, muito semelhante à formulação inicial C436, bastante aromática e algo amarga.

4.3 Análise sensorial

Como já referido, estipulou-se um número mínimo de 30 provadores não-treinados, tendo-se obtido 31. O inquérito de prova incluía questões básicas como, sexo, idade, se o provador era consumidor de bebidas alcoólicas e de *saké*.

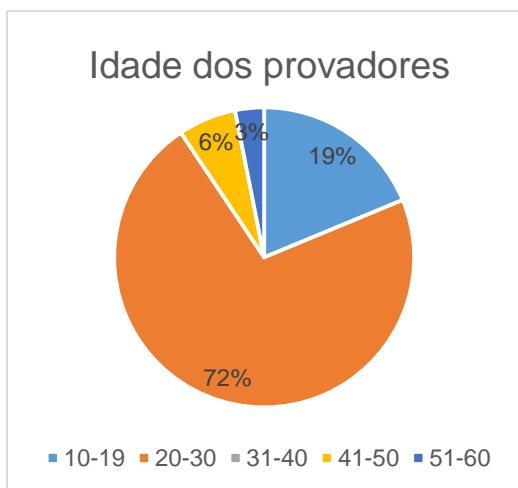


Figura 39: Idade dos provadores.

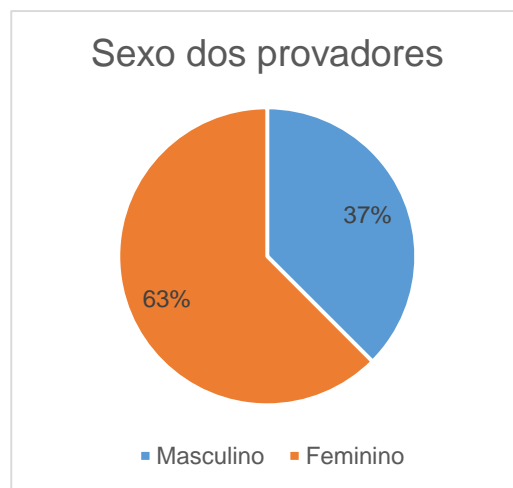


Figura 38: Sexo dos provadores.

A esmagadora maioria dos provadores estava inserido na faixa etária dos 20-30 anos (72%), seguido de 10-19 (19%), 41-50 (6%) e por fim 51-60 (3%) (Figura 38).

A maioria dos provadores era ainda do sexo feminino (63%), com apenas 37% do sexo masculino (Figura 39).



Figura 40: Avaliação do consumo de bebidas alcoólicas.

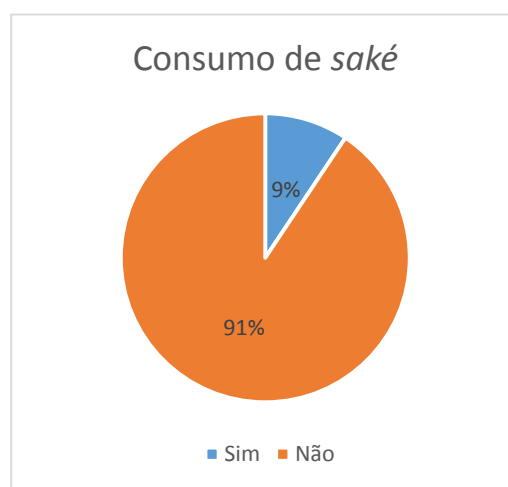


Figura 41: Avaliação do consumo de saké.

Quase a totalidade dos provadores revelou ser consumidor de bebidas alcoólicas (97%) e também não ser consumidor de saké (91%). Apenas 3% dos consumidores afirmou não ser consumidor de bebidas alcoólicas e 9% afirmou ser consumidor de saké (Figuras 40 e 41).

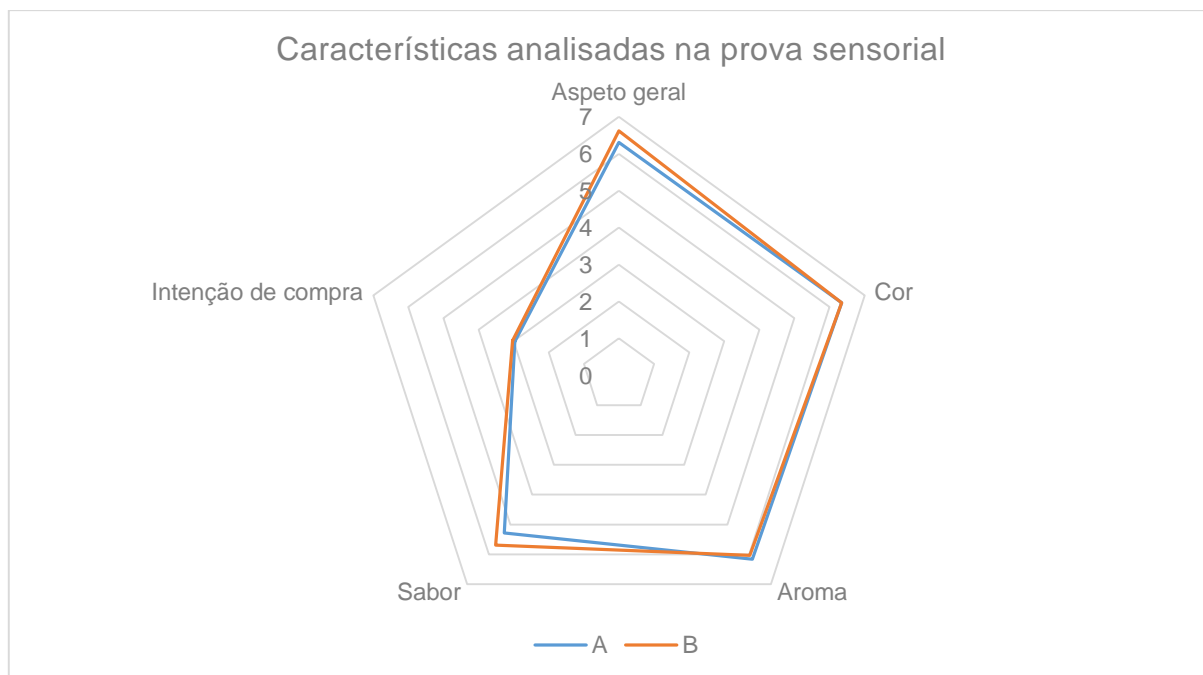


Figura 42: Avaliação das características sensoriais

As características analisadas (aspecto geral, cor, aroma e sabor) foram avaliadas numa escala de 1 a 9 (Anexo V), enquanto a intenção de compra foi avaliada numa escala de 1 a 5.

No caso do aspecto geral, observou-se uma média de 6,3125 para a amostra A (Formulação Fc) e 6,625 (Formulação Fc diluída), sendo este valor moderadamente positivo. A cor registou o mesmo valor para ambas as amostras, com 6,34375, de novo um valor moderadamente positivo (Figura 42).

O aroma obteve um valor de 6,15625 para A e 6,03125 para B, um valor muito semelhante e de novo moderadamente positivo. Por outro lado, o sabor registou valores de 5,28125 para A e 5,6875 para B, valores mais baixos que as restantes características, estando ligeiramente acima da indiferença. Os provadores demonstraram assim uma ligeira preferência pelo sabor da amostra B (mais diluída) (Figura 42).

Apesar da apreciação geral e particular das várias características sensoriais da bebida ter sido positiva, a intenção de compra obteve um valor de 2,96875 para a amostra A e 3,03125 para B, valores muito semelhantes, revelando uma intenção moderadamente positiva de compra mas mais próxima da indiferença (Figura 42).

Esta discrepância poderá estar relacionado com o facto de a maior parte dos consumidores não ser habitualmente consumidora de *saké*, provavelmente desconhecendo até a

existência da bebida. Para além disso, este tipo de bebida está muito associada ao consumo de comida japonesa que não é habitualmente confeccionada em casa, na cultura em que estes provadores estão inseridos. Assim, o seu consumo está muito mais associado à frequência de espaços de restauração onde o consumidor se desloca para consumir este tipo de pratos de origem japonesa do que à sua compra em espaços comerciais para consumo doméstico.

5. Discussão geral e perspectivas futuras

A produção de *saké* ou de bebidas que usem o mesmo tipo de processo base, implica a existência de uma hidrólise do substrato amiláceo (arroz ou outro) por parte de *A. oryzae* que desdobra o amido em açúcares mais simples, e de uma fermentação alcoólica por estirpes de *S. cerevisiae* que utilizam os açúcares resultantes da ação das amílases do fungo. Esta fermentação em simultâneo, leva a que se o processo decorra sem que se registem concentrações elevadas de substratos, sendo estes convertidos a etanol sem que existam condições de stress osmótico que se observam por exemplo no início do processo de fermentação do mosto de uva (vinho) ou do malte após brassagem (cerveja).

De acordo com o esperado, verificou-se que o longo das fermentações efetuadas as concentrações de açúcares se mantiveram em níveis baixos, observando-se um decréscimo das suas concentrações para os pontos finais de fermentação.

A par disso, a fermentação ocorre a temperaturas baixas (entre 7 e 16°C) o que leva a que a toxicidade do etanol não seja tão pronunciada, permitindo que, caso existam açúcares fermentescíveis os níveis finais de etanol possam ser mais elevados. No caso do presente trabalho, nenhuma das formulações produziu uma bebida com um teor alcoólico semelhante ao esperado de *saké* (13-17% com alguns géneros a atingir 20%), sendo que apenas a formulação final atingiu um valor aceitável (13,25%).

A partir do estudo das 14 formulações, conclui-se que a formulação C436, com um acerto na quantidade de leveduras a inocular, é a formulação com maior potencial para produzir uma bebida fermentada.

A maioria das formulações produzidas demonstrou uma acidez muito elevada e um persistente sabor amargo, com um sabor residual semelhante a cerveja, sendo claro o aroma a castanha. No caso da formulação final, esta apresentou a menor acidez de todas as formulações, com um sabor suave, denotando-se vagamente o sabor a álcool. A estirpe CBS 436 foi a que conferiu um perfil mais aromático ao produto final.

Optou-se pela utilização do *koji* produzido a partir de arroz, visto que o *koji* produzido a partir de castanha produziu uma quantidade de biomassa muito elevada em muito menos tempo, conferindo uma acidez elevadíssima ao produto final, tornando-o muito pouco apelativo organoleticamente. Foi também selecionado o uso de castanha crua em vez de cozida a vapor, uma vez que o processo de cozedura aumenta a disponibilidade do amido para hidrólise, aumentando em muito a velocidade de fermentação uma vez que a mistura seja inoculada com as leveduras. Esta velocidade prende-se com o facto de existirem um grande teor de açúcares simples, a juntar à fração naturalmente disponível na castanha, para

quaisquer microrganismos utilizarem como substrato, já que este processo não requer condições de assepsia.

A castanha mostrou-se desta forma um produto de uma dificuldade considerável para fermentação, tendo também demonstrado algum potencial para produção de outros géneros alimentícios, como por exemplo, o vinagre, dada a elevada acidez de grande parte das formulações produzidas, sendo de algum interesse o teste futuro desta possibilidade.

Em termos de aceitação por parte dos provadores, esta foi moderadamente positiva, no caso da intenção de compra muito perto da indiferença, uma reação algo expectável dadas as características da bebida final produzida.

6. Referências bibliográficas

- Aikawa, M., Suizu, T., Ichikawa, E., Kawato, A., Abe, Y. e Imayasu, S. 1991. Breeding of a higher malic acid-productive mutants from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no.7 (K-7). Hakkokogaku Kaishi. 70:473-477
- Akada, R., Matsuo, K., Aritomi, K. e Nishizawa, Y. 1999. Construction of recombinante sake yeast containing a dominant FAS2 mutation without extraneous sequences by a two-step gene replacement protocol. J. Biosci. Bioeng. 87:43-48
- Asano, T., Kurose, N. e Tarumi, S. 2001. Isolation of a high-malate-producing sake yeasts from low-maltose assimilating mutants. J. Biosci. Bioeng. 92:429-433
- Ashida, S., Ichikawa, E., Suginami, K. e Imayasu, S. 1987. Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component. Agric. Biol. Chem. 51:2061-2065.
- Atkinson, R.W. 1881. The Chemistry of Sake Brewing. Tóquio, Japão. Universidade de Tóquio. 94 p.
- Battaglini, R., Huergo, M., Pilosof A. M. R. e Bartholomai, G. B. 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Buenos Aires, Argentina. Applied Microbiology and Biotechnology, 5:292-296.
- Braga, N. C. C. O. 2014. Valorização de subprodutos de *Castanea sativa*: casca e ouriço. Dissertação para obtenção de grau de mestre. Universidade do Porto – Faculdade de Farmácia. 52 p.
- Brenda – The Comprehensive Enzyme Information System [Acesso em: 23 de Agosto de 2015]. Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org/>
- CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre [acesso em 15 de Agosto de 2015]. Disponível em: www.cbs.knaw.nl
- Chancharoonpong , C., Hsieh, P. e Sheu, S. 2012. Production of enzyme and growth of *Aspergillus Oryzae* S. on soybean koji. Bangucoque, Tailândia e Taiwan, China. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, vol.2, No. 4. DOI: 10.7763/IJBBB.2012.V2.106.
- Demiate, I. M., Oetterer, M., e Wosiaki, G. 2001. Characterization of Chestnut (*Castanea sativa*, Mill) Starch for Industrial Utilization. Brasil. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol 44. N. 1: pp. 66-78.

- Fukuda, K., Wanatabe, M., Asano, K., Ouchi, K. e Takasawa, S. 1991. Isolation and genetic study of a p-fluoro-DL-phenylalanine-resistant mutants overproducing β -phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 20:449-452
- Hara, M., Sasaki M., Obata T. e Nojiro, K. 1967. Isolation of an ethanol-resistant strain from sake yeast Kyokai no.7. Japão. J. Brew. Soc. 71:301-304
- Hirosawa, I., Aritomi, K., Hoshida, H., Kashiwagi, S., Nishizawa, Y. e Akada, R. 2004. Construction of a self-cloning sake yeast that expresses alcohol acetyltransferase gene by a two-step gene replacement protocol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65:68-73.
- Hirata, D., Aoki, S., Watanabe, K., Tsukioka, M. e Suzuki, T. 1992. Breeding of a usefull strain of sake yeast for *Ginjo*-sake brewing. J. Ferment. Bioeng. 73:497-499
- Horie, K., Oba, T., Motomura, S., Isogai, A., Yoshimura, T. *et al.* 2010. Breeding of a low pyruvate-producing sake yeast by isolation of a mutant resistant to ethyl α -transcyanocinnamate, an inhibitor of mitochondrial pyruvate transporte. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74:843-847
- Hutkins, R. W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell Publishing. 457 p.
- Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K. e Imayasu, S. 1991. Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. Agric. Biol. Chem. 35:1024-1032
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge [Acesso em 20 de Agosto de 2015]. Disponível em: <http://www.insa.pt/>
- Institute of Food Technologists. 1981. Cit. Por: Silva, L. C. C. Formação de um painel de provadores para diferenciação da bebida do café. 2013. Dissertação para obtenção de grão de mestre. Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia
- Index Fungorium [acesso em 17 de Agosto de 2015]. Disponível em: <http://www.indexfungorium.com/>
- Japan Sake and Soshu Makers Association (JSSM) e National Research Institute of Brewing (NRIB) 2011. A Comprehensive Guide to Sake. 1ª ed. Ed. Japan Sake and Shochu Makers Association, Tóquio, Japão. 68 p.
- Kitagaki, H. e Kitamoto, K. 2013. Breeding Research on Sake Yeasts in Japan: History, Recent Technologic Advances and Future Perspectives. The Annual Review of Food Science and Technology. 4:215-235

- Kitamoto, K., Oda-Miyazaki, K., Gomi, K. e Kumagai, C. 1993. Mutant isolation of non-urea producing sake yeast by positive selection. J. Ferment. Bioeng. 75:359-363
- Koseki T., Kudo, S., Matsuda, Y., Ishigaki, H., Anshoku, Y. et al. 2004. A high tyrosol-producing sake yeast mutant and alcohol beverage utilizing the mutant. Japão. Open. Pat. Gaz. 2004-215644
- Kitagaki, H., Kato, T., Isogai, A., Mikami, S. e Shimoi, H. 2008. Inhibition of mitochondrial fragmentation during sake brewing causes high malate producing in sake yeast. J. Biosci. Bioeng. 105:675-678
- Ludwig V. S. 2004. A agroindústria processadora de arroz: Um estudo das principais características organizacionais e estratégias das empresas líderes gaúchas. Dissertação para obtenção de pós-graduação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 160 p.
- Mirvish, SS. 1968. The carcinogenic action and metabolism of urethan and N-hydroxyurethan. Advs Cancer Res. 11:1-42
- Mizoguchi, H., Yamauchi, T. e Nishimura A. 1999. Characterization of a PDR1 mutant allele from a clotrimazole-resistant sake yeast mutant with improved fermentative activity. Hakkokogaku Kaishi. 65:1-7
- Machida, M., Yamada, O. e Gomi, K. Genomics of *Aspergillus Oryzae*: Learning the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. 2008. DNA Research Institute. 15, 173-183
- Noronha, J. F. 2003. Material de apoio às aulas de Análise Sensorial. Escola Superior Agrária de Coimbra
- Ouchi, K. e Akiyama H. 1971. Non-foaming mutants of sake yeast selection by cell agglutination method and by froth flotation method. Agric. Biol. Chem. 35:1024-1032
- Ouchi, K., Shimoda, M., Nakamura, Y., Kojima, Y. e Nishiya, T. 1983. Isolation of auxotrophic mutants from industrial yeasts. Hakkokogaku Kaishi. 61:349-352
- Prista, C. (2015) When traditional Western crops meet Eastern microbial eukaryotic fermenters for the production of innovative “gourmet” food. Legumes perspectives. 9:14-15.
- Russouw, D., Naes, T. e Bauer F. F. 2008. Linking gene regulation and the exo-metabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. BMC Genomics, 9:530-548. Cit. Por: Viana, T. M. L. 2009. Caracterização bioenergética de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação vinária. Dissertação para obtenção de grau de mestre. Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. 110 p.

Silva, L. M., Capitão, C. M., Veiga, I. A., Noéme, C. 2009. Inovação e Tecnologia na Formação Agrícola. Lisboa. Associação dos Jovens Agricultores de Portugal. 101p.

Soejima, H., Tsuge, K., Yoshimura, T., Koganemaru, K. e Kitagaki, H. 2012. Breeding of a high tyrosol-producing sake yeast by isolation of an ethanol-resistant mutant from tpr3 mutant. J. Inst. Brew. 118(3):264-268

Tsutsumi, H., Namise, M., Ojima, T., Suizi, T., Kawato, A. e Abe, Y. 2002. Breeding a high isoamyl acetate-producing sake yeast and its utilization. Japão. Open. Pat. Gaz. 2002-191355

Universidade Federal do Rio Grande do Sul [Acesso em 15 de Agosto de 2015]. Disponível em: http://www.ufrgs.br/alimentus1/terradearroaz/grao/gr_esquema_popup.htm

Wanatabe, M., Tanaka, N., Mishima, H. e Takemura S. 1993. Isolation of sake yeast mutants resistant to isoamyl monofluoroacetate to improve iso amyl acetate productivity. J. Ferment. Bioeng. 76:229-231

Yamada, T., Araki, Y., Zhou, Y., Maeya, N., Akao, T. e Shimoi, H. 2012. Isolation of copper-tolerant mutants of sake yeast with defective peptide uptake. J. Biosci. Bioeng. 100:460-465

Yoshida, K., Inahashi, M., Nakamura, K. e Nojiro, K. 1993. Breeding of a sake yeast having high productivities of flavour esters and low productivity. J. Brew. Soc. Jpn. 88:564-569

Yoshizawa, K., Ishikawa, T. 2004. Industrialization of sake manufacture. Cit. Por: Huge, S. Assays of hydrolysis and fermentation of various starchy substrates using the traditional sake production techniques in order to obtain an alcoholic beverage. 2014. Dissertação para obtenção de grau de mestre. Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. 83 p.

Anexos

Anexo I

Estirpes de levedura utilizadas e suas características

Estirpe	Outros nomes	Categoria de substrato	Temperaturas de crescimento	pH ótimo	Fermentação	Hidrólise de ureia	Formação de ácido acético	Crescimento em etanol
CBS 436	Saccharomyces yedo; Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus	saké	25°C-37°C (Não cresce acima de 40°C, inclusive)	<10	Positivo para: D-Glucose, D-Galactose, Maltose, Sucrose, Rafinose	Não	Não	Sim
CBS 1198	S. sake	saké	25°C-40°C (Não cresce acima de 42°C)	-	Positivo para: D-Glucose, D-Galactose, Maltose, Sucrose, Rafinose	Não	Não	Sim

Estirpe de fungo utilizada e suas características

Estirpe	Outros nomes	Tipo de organismo	Categoria de substrato	Temperaturas de crescimento	pH ótimo	Fermentação
CBS 817.72	Aspergillus oryzae var. brunneus	Fungo filamentoso	Koji	24 – 36 °C	-	-

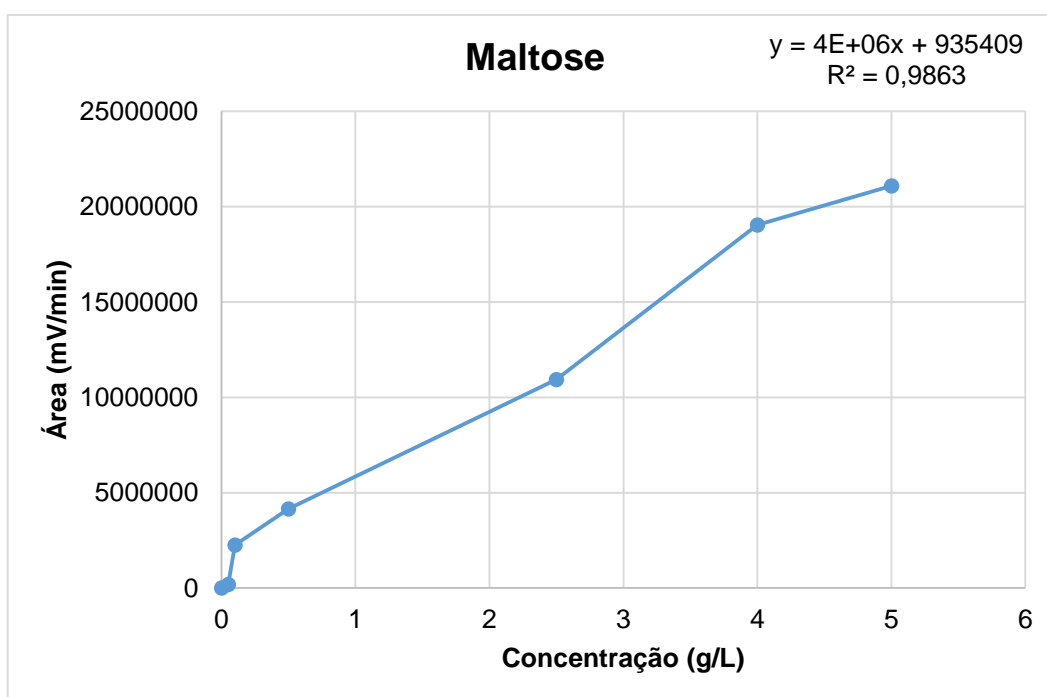
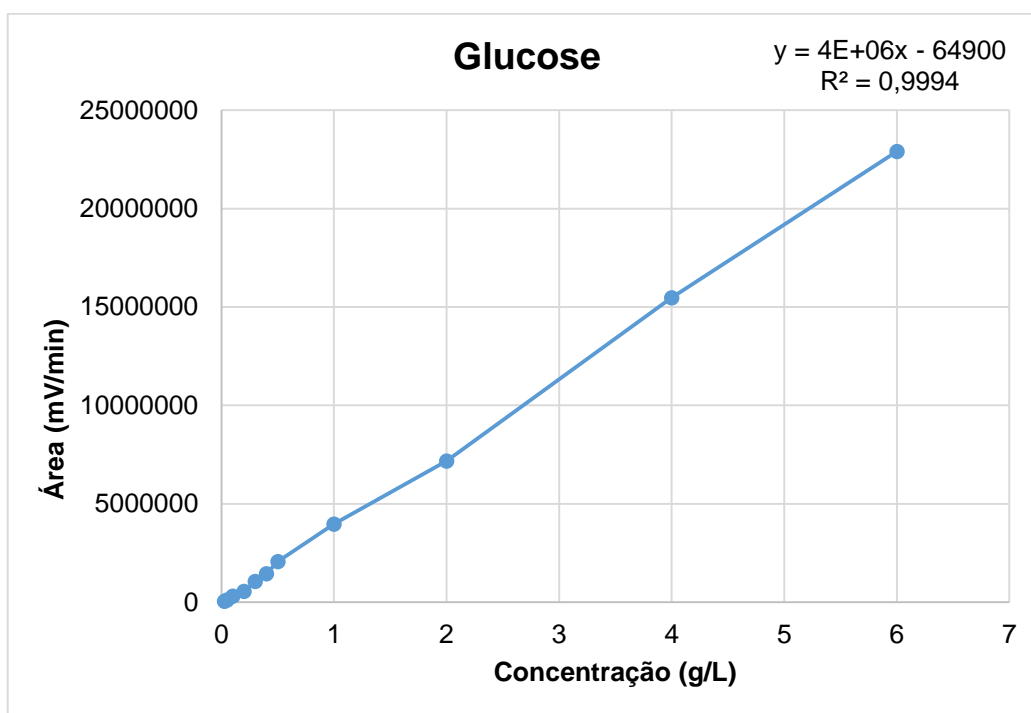
Anexo II

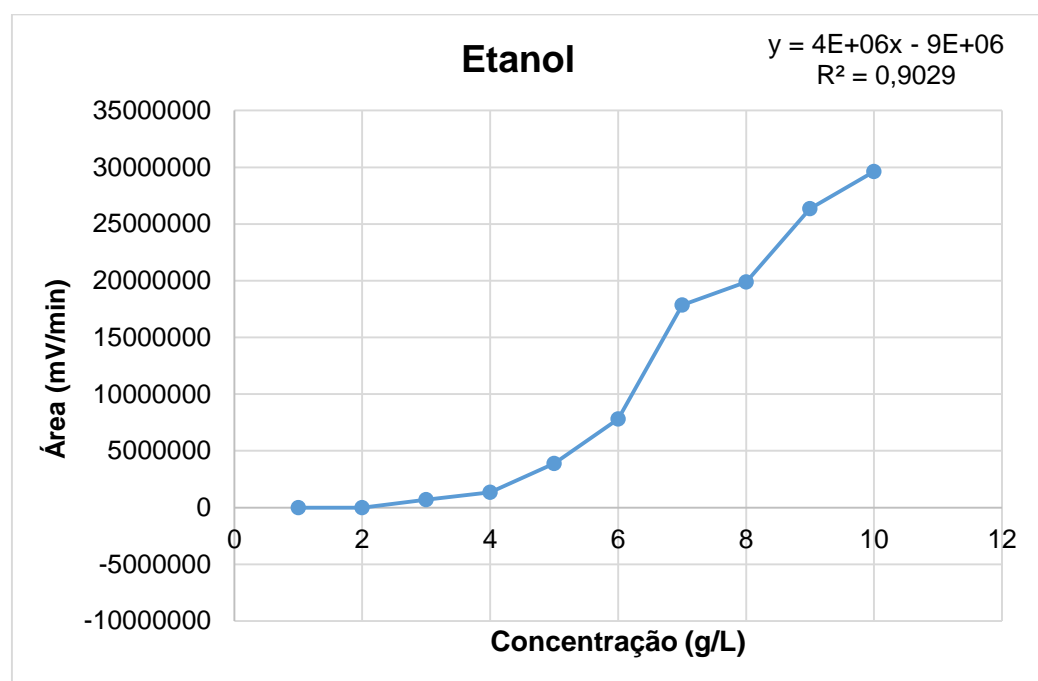
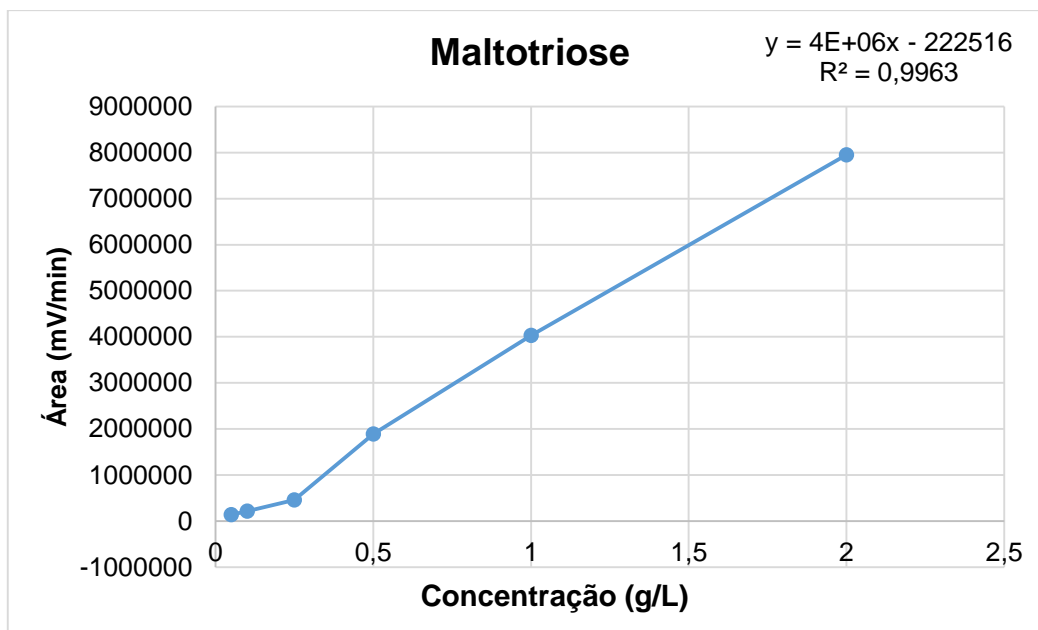
Composição dos meios de cultura utilizados

Componente	Porcentagem (m/v ou m/m)	
	YPD	MEA
Agar	2	2
Glucose	2	0
Extrato de levedura	1	0
Peptona	2	0
Extrato de malte	0	2

Anexo III

Curvas de calibração





Anexo IV

Tempos de retenção

Utilizando os dados obtidos a partir de cada amostra, foram determinadas as concentrações de cada composto em cada uma das formulações ao longo do tempo. Para tal, o valor da área de cada composto, foi inserido em cada equação obtida através das curvas de calibração, sendo assim determinada concentração. Cada composto é identificado por um tempo de retenção específico. Após a elaboração das curvas de calibração, observou-se um ligeiro desvio nos tempos de retenção, relativamente ao previsto.

Composto	Tempo de retenção a 5mM (minutos)	Desvio no tempo de retenção a 5mM (minutos)
Maltotriose	9.03	10.32
Maltose	9.8	11.15
Glucose	11.32	12.8
Etanol	23.43	26.4

Anexo V

Ficha de prova

Nome _____ Idade _____

Sexo: () Masculino () Feminino

Ocupação:

Consome bebidas alcoólicas?

É consumidor de sake?

Amostra:

Aspecto Geral:	
9 – Gostei extremamente	
8 – Gostei muito	
7 – Gostei moderadamente	
6 – Gostei ligeiramente	
5 – Não gostei nem desgostei	
4 – Desgostei ligeiramente	
3 – Desgostei moderadamente	
2 – Desgostei muito	
1 – Desgostei extremamente	

Cor:	
9 – Gostei extremamente	
8 – Gostei muito	
7 – Gostei moderadamente	
6 – Gostei ligeiramente	
5 – Não gostei nem desgostei	
4 – Desgostei ligeiramente	
3 – Desgostei moderadamente	

2 – Desgostei muito	
1 – Desgostei extremamente	

Aroma:	
9 – Gostei extremamente	
8 – Gostei muito	
7 – Gostei moderadamente	
6 – Gostei ligeiramente	
5 – Não gostei nem desgostei	
4 – Desgostei ligeiramente	
3 – Desgostei moderadamente	
2 – Desgostei muito	
1 – Desgostei extremamente	

Sabor:	
9 – Gostei extremamente	
8 – Gostei muito	
7 – Gostei moderadamente	
6 – Gostei ligeiramente	
5 – Não gostei nem desgostei	
4 – Desgostei ligeiramente	
3 – Desgostei moderadamente	
2 – Desgostei muito	
1 – Desgostei extremamente	

Intenção de compra:	
5 – De certeza que compraria	
4 – Provavelmente compraria	
3 – Não sei se compraria	
2 – Provavelmente não compraria	
1 – De certeza que não compraria	

Comentários/sugestões: